

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**

**DANILO ROCHA CAMPANHA**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
CREATINA EM SUPLEMENTOS POR HPLC COM DETECTOR DE UV-VIS**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

Danilo Rocha Campanha

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CREATINA  
EM SUPLEMENTOS POR HPLC COM DETECTOR DE UV-VIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Química do CEFET-MG como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica

Orientador: Professor Dr. Patterson Patrício de Souza

Co-orientadora: Ms. Ingrid Amélia dos Santos Matusinho

Belo Horizonte  
2023

Danilo Rocha Campanha

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CREATINA  
EM SUPLEMENTOS POR HPLC COM DETECTOR DE UV-VIS

Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em Química Tecnológica  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2023

---

Professor Dr. Patterson Patrício de Souza  
(Orientador – CEFET/MG)

---

Ms. Ingrid Amélia dos Santos Matusinho  
(Co-orientadora - CEFET/MG)

---

Professora Dra. Flávia Augusta Guilherme Gonçalves Rezende  
(Avaliadora - CEFET/MG)

---

Ms. Tiago Aparecido da Silva  
(Avaliador - FUNED)

*[Y]ou will get the same result if you perform the same experiment on Monday or Thursday (or whenever). (...) if you have an equation that describes a process at a particular instant, then the same equation applies at any other instant. In other words, the laws of nature don't change with time.*

Peter Atkins

## AGRADECIMENTOS

Não se faz um curso de graduação ou um TCC sozinho. Nesta página, onde se permite um pouco mais de emoção e um pouco menos de técnica, fica registrada minha gratidão aos que contribuíram com a conclusão desse curso e com a realização deste trabalho.

Ao Patterson e à Ingrid, pelos ensinamentos que conduziram a realização deste projeto;

Aos colegas do Intechlab, pelas contribuições durante as atividades experimentais, pelo café e pela descontração;

À Raquel, pela orientação assídua desde o começo do curso e por estar à disposição para lembrar que desistir não é uma opção;

Ao Binatti e ao Breno, pelas oportunidades nos tempos de pandemia, e à Ívina, pela primeira oportunidade lá no começo;

À Janice e ao Márcio, pela disposição 24/7 para atender aos pedidos de matrícula até na última hora do último dia de ajuste;

À Núria, pela orientação cuidadosa no estágio e pelos bolos;

À Lívia, pelas lições de Estatística, com uma didática paciente, rigorosa e descontraída;

A todos os demais professores, meus exemplos de profissionais dedicados à Educação e à Ciência, em um país tão necessitado de ambas;

Às queridas Ana, Fabi e Aline e à insubstituível Carol, pelas grandes lições para o trabalho e para a vida e pelas contribuições impagáveis a este e a todos os trabalhos de 2023;

À Gláucia e aos demais profissionais da limpeza e da manutenção, pelo esforço de Sísifo para manter o CEFET limpo e funcionando;

Ao CNPq e ao CEFET/MG, pelos auxílios financeiros que possibilitaram minha permanência no ensino superior;

À minha família, pelo privilégio de me dedicar aos estudos em tempo integral;

Aos meus amigos graduandos pela ajuda nas matérias mais difíceis, pela lealdade, pela empatia, pelos cafés e pães de queijo, pelo apoio financeiro quando a bolsa atrasava, pelos sorvetes, pela diversão e por terem tornado os dias como graduando mais suportáveis e menos solitários.

## RESUMO

No presente trabalho foi realizado o processo de validação de um método para determinação do teor de creatina em suplementos alimentares por HPLC com detector de UV-Vis. Nos testes de linearidade, foi possível obter  $r^2 > 0,999$ . Nos testes das premissas de regressão, os resíduos foram considerados homocedásticos e normalmente distribuídos, pelos testes de Levene-Brown-Forsythe e de Anderson Darling, respectivamente, mas não foram considerados independentes, pelo teste de Durbin-Watson, ao nível de confiança de 95%. Na verificação da seletividade, pela comparação das inclinações médias de curvas de calibração interna e externa, comprovou-se que não há efeito de matriz significativo. Os limites de detecção e de quantificação foram estimados pelos parâmetros das curvas, chegando a 0,67 e 2,22 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método apresentou exatidão satisfatória, com recuperação entre 90 e 107%. A precisão, medida como repetibilidade, também foi satisfatória, com DPR < 5%. Ao final deste trabalho, o método pode ser considerado parcialmente validado. Apesar de a premissa de independência dos resíduos não ter sido confirmada pelo teste aplicado, todos os demais resultados indicam a adequação do método estudado. Esta validação ainda pode ser complementada com a repetição da calibração em concentrações mais baixas, com testes de precisão intermediária (intralaboratorial) e de reprodutibilidade (interlaboratorial) e com ensaios para verificação da robustez.

**Palavras-chave:** Validação; Cromatografia; Creatina; Suplemento.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ADP – Adenosina difosfato

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Agricultural Chemists*

ATP – Adenosina trifosfato

CGCRE – Coordenao Geral de Acreditao

CMD – Concentrao média determinada

CV – Coeficiente de variao

DOQ – Documento de caráter orientativo da qualidade

DPR – Devio padrão relativo

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IN – Instruo Normativa

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalizao e Qualidade Industrial

LC-MS – *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*

LD – Limite de deteco

LQ – Limite de quantificao

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MRC – Material de Referência Certificado

RDC – Resoluo da Diretoria Colegiada

S/N – *signal/noise ratio*

SCF – *Scientific Committee on Food*

SE – Soluo estoque

t<sub>R</sub> – Tempo de reteno

UV-Vis – Região do espectro do espectro eletromagnético que compreende às faixas ultravioleta e visível

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da creatina .....	3
Figura 2 - Estrutura molecular da fosfocreatina .....	4
Figura 3 - Conversão irreversível da creatina em creatinina com perda de água .....	4
Figura 4 - Cromatograma da solução padrão de creatina monoidratada a 20 mg L <sup>-1</sup> na calibração externa .....	22
Figura 5 - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 1, $y = 41102x + 289416$ .....	25
Figura 6 - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 2, $y = 42672x + 309205$ .....	25
Figura 7 - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 3, $y = 41204x + 282638$ .....	25
Figura 8 - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 1 .....	26
Figura 9 - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 2 .....	26
Figura 10 - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 3 .....	26
Figura 11 - Dispersão dos pontos nas calibrações externa (em vermelho) e interna (em preto) .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo da curva de calibração externa.....	20
Tabela 2 - Preparo da curva de calibração interna.....	20
Tabela 3- Resultados das medidas para as curvas de calibração externa .....	23
Tabela 4 - Parâmetros de regressão obtidos em cada calibração externa .....	24
Tabela 5 - Resultados dos testes de homocedasticidade.....	27
Tabela 6 - Resultados do teste de Durbin-Watson .....	28
Tabela 7 - Resultados de teste de Anderson-Darling .....	29
Tabela 8 - Comparação entre as inclinações médios das curvas de calibração .....	30
Tabela 9 - Limites de detecção e de quantificação .....	31
Tabela 10 - Resultados dos testes de recuperação .....	32
Tabela 11 - Resultados dos testes de precisão .....	32

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Creatina: propriedades físico-químicas e metabolismo .....	3
2.2	Suplementos alimentares: normas, eficácia e segurança.....	4
2.3	Métodos cromatográficos para determinação de creatina: uma breve revisão .....	6
2.3.1	Condições cromatográficas.....	6
2.3.2	Parâmetros de validação .....	7
2.4	Validação de métodos analíticos .....	10
2.4.1	Linearidade .....	10
2.4.1.1	Homocedasticidade .....	12
2.4.1.2	Independência.....	14
2.4.1.3	Normalidade .....	15
2.4.2	Seletividade.....	16
2.4.3	Limite de detecção e limite de quantificação .....	17
2.4.4	Tendência/Recuperação .....	17
2.4.5	Precisão.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1	Condições cromatográficos .....	19
3.2	Preparo da fase móvel .....	19
3.3	Preparo das soluções estoque e das curvas de calibração .....	19
3.4	Avaliação da linearidade .....	20
3.5	Avaliação da seletividade.....	21
3.6	Estimação dos limites de detecção e de quantificação.....	21
3.7	Análise da tendência/recuperação .....	21
3.8	Análise da precisão .....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22

4.1 Linearidade.....	22
4.2 Seletividade.....	29
4.3 Limites de detecção e de quantificação.....	31
4.4 Recuperação e precisão.....	31
5 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

## 1 INTRODUÇÃO

O comércio de suplementos alimentares vem se tornando um negócio cada vez mais rentável no Brasil. Dentre as várias opções oferecidas ao consumidor, a creatina popularizou-se tanto entre atletas de elite quanto amadores.[1] Por se tratar de uma molécula que atua no metabolismo energético em atividades intensas, a suplementação de creatina é associada à melhoria da performance na prática de exercícios físicos de alta intensidade. No entanto, com o aumento da circulação de suplementos, surge também uma preocupação em relação à garantia da segurança e dos direitos do consumidor.[2]

A garantia da qualidade demanda técnicas de análise qualitativa e quantitativa capazes de gerar resultados confiáveis. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, doravante HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), possibilita a análise de uma grande variedade de compostos, mesmo em concentrações muito baixas, em diversos tipos de matriz. Além disso, várias amostras podem ser analisadas em um tempo relativamente curto de forma automatizada e com resultados reprodutíveis. Conforme os objetivos da análise, essa técnica de separação pode ser combinada com diversos tipos de detectores, possibilitando tanto a quantificação quanto a identificação de compostos em misturas complexas. Por esses motivos, essa técnica vem sendo crescentemente aplicada em diversas áreas, seja nas análises clínicas, nas análises forenses ou no controle de qualidade de produtos industrializados como fármacos e alimentos.[3]

A qualidade de métodos analíticos é assegurada por meio de processos de validação, que envolvem etapas convencionadas por órgãos oficiais e institutos de pesquisa nacionais e internacionais. Nesse processo, as técnicas analíticas são testadas por meio de recursos estatísticos que garantem a adequação dos dados aos modelos matemáticos e asseguram a confiabilidade dos resultados. Além disso, a validação deve garantir também a adequação do método de análise ao laboratório onde será aplicado.[4] Para tanto, são testados os parâmetros de desempenho do método, também chamadas de figuras de mérito, tais como, linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação e precisão.[5]

O método a ser validado neste trabalho foi baseado na proposta de Dash e Sawhney (2002) e é utilizado no Intechlab para controle de qualidade de suplementos de creatina monoidratada. O Intechlab trata-se de um laboratório de pesquisa e desenvolvimento localizado no *campus* Nova Gameleira do CEFET-MG, coordenado

pelos professores Patterson Patrício, Patrícia Patrício e Emerson Pedroso. Além do controle de qualidade de suplementos alimentares, são desenvolvidos também vários outros projetos de pesquisa tanto de interesse acadêmico quanto voltados para o atendimento de demandas atuais da comunidade regional e nacional.

Nesse contexto, considerando a necessidade de técnicas avançadas e automatizadas para garantia da qualidade, o presente trabalho propõe validar uma metodologia aplicada na rotina do Intechlab para quantificação de creatina em suplementos alimentares utilizando HPLC com detector de UV-Vis. Para tanto, pretende-se avaliar os parâmetros de desempenho de um método previamente proposto seguindo orientações de órgãos oficiais nacionais. Como parte deste trabalho inclui-se a elaboração de planilhas do Microsoft Excel para realização dos cálculos estatísticos.

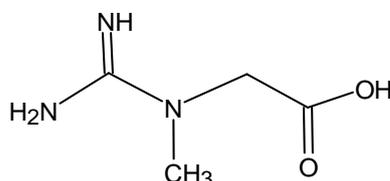
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, para começar, são apresentados alguns aspectos físico-químicos da creatina e de substâncias relacionadas ao seu metabolismo. Em seguida, apresentam-se algumas informações gerais sobre suplementos alimentares no Brasil e, mais especificamente, sobre a suplementação de creatina. Passa-se, então, para uma breve revisão da literatura sobre métodos desenvolvidos e validados para determinação do mesmo analito, com ênfase nos métodos cromatográficos. Por fim, são explicadas as etapas do processo de validação, destacando os aspectos mais relevantes para este trabalho, incluindo a Estatística aplicada ao tratamento dos dados.

### 2.1 Creatina: propriedades físico-químicas e metabolismo

A creatina, também denominada ácido metilguanidinoacético, é um sólido branco cristalino, que pode ser encontrada na forma monoidratada ou anidra. Esse composto, isolado de extratos de tecidos musculares em 1832, apresenta a estrutura molecular mostrada na Figura 1, massa molar de  $131,13 \text{ g mol}^{-1}$  e ponto de fusão de  $292^\circ\text{C}$ . [6]

**Figura 1** - Estrutura molecular da creatina

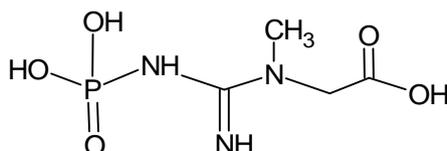


Pouco tempo depois de sua descoberta, a creatina foi associada à atividade física por estudos que mostraram sua presença significativamente maior em animais selvagens do que naqueles criados em cativeiro. [7] Atualmente, a creatina monoidratada é um dos suplementos mais consumidos por atletas profissionais e amadores e é, também, uma das formas de suplementação mais estudadas. [2]

No organismo humano, assim como em outros animais, a creatina é produzida naturalmente em um processo que se inicia nos rins e se completa no fígado. Em um homem adulto saudável de 70 Kg, a reserva de creatina pode chegar a 120 g, da qual a maior parte é armazenada nos músculos. [7] Durante atividades que exigem um maior consumo energético a creatina funciona como facilitadora da reconversão de ADP em ATP. O mecanismo bioquímico desse processo já é bem conhecido e descrito na

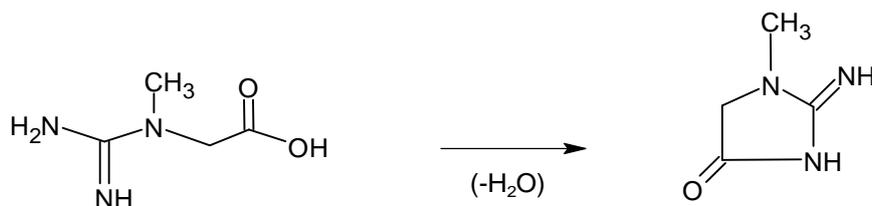
literatura.[7] De maneira resumida, a fosfocreatina, forma fosforilada da creatina, representada na Figura 2, é a responsável pelo estoque e pela disponibilização rápida de fosfato nas atividades mais intensas, através de reações enzimáticas reversíveis. Alguns estudos também já evidenciaram a presença da creatina no cérebro exercendo a mesma função.[7, 8]

**Figura 2** - Estrutura molecular da fosfocreatina



O ciclo de vida da creatina no corpo se conclui com a sua desidratação, uma reação não enzimática e irreversível que leva à formação da creatinina, como representado na Figura 3. Na urina de seres humanos adultos saudáveis, a creatina é encontrada em quantidades traço, enquanto a creatinina tende a estar presente em concentrações mais altas, que podem variar dependendo da massa muscular de cada indivíduo.[7] No entanto, quando a suplementação é feita de forma exagerada ou em algumas condições patológicas, a creatina em excesso pode ser excretada diretamente.[2]

**Figura 3** - Conversão irreversível da creatina em creatinina com perda de água



## 2.2 Suplementos alimentares: normas, eficácia e segurança

No Brasil, os suplementos alimentares correspondem a uma categoria específica de alimentos e são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).[9, 10] Por meio da RDC 243/2018, suplemento alimentar é definido como “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados”. [10] O mesmo documento proíbe que os rótulos de suplementos alimentares aleguem, de forma implícita ou explícita, que esses

produtos possuam finalidade medicamentosa ou terapêutica, ou que contenham substâncias não autorizadas ou proibidas. É proibido também que os fabricantes aleguem que a alimentação sem suplementação não seja capaz de fornecer as doses diárias recomendadas de componentes necessários à saúde, ou que o suplemento seja comparável ou superior a alimentos convencionais.[10]

Por meio da IN 28/2018, a ANVISA estabelece que todo suplemento de creatina deve fornecer a dose diária de 3000 mg para adultos com idade igual ou superior a 19 anos.[9] Além disso, o mesmo documento autoriza que o rótulo, uma vez que o produto atenda aos critérios quanto à dose recomendada, alegue que “a creatina auxilia no aumento do desempenho físico durante exercícios repetidos de curta duração e alta intensidade”. [9] Qualquer outra alegação quanto à funcionalidade da suplementação de creatina é ilegal. Além disso, a ANVISA não recomenda a suplementação de creatina por gestantes, lactantes e crianças, e essa advertência deve constar também no rótulo do produto.[9]

Os estudos disponíveis apontam que a biodisponibilidade de creatina pode ser influenciada pela co-ingestão de macronutrientes, como carboidratos e proteínas. Além disso, existe um consenso que a suplementação de creatina seja feita em duas fases. A primeira fase tem objetivo de promover o estoque de creatina pela ingestão de 20 g por dia durante 4 a 5 dias, ou 3 g por dia durante um mês. Na segunda fase, os níveis das reservas de creatina nos músculos são mantidos com uma suplementação diária de 2 a 3 g de creatina. Os mesmos estudos ressaltam que existe uma grande variabilidade na taxa individual de incremento do acúmulo de creatina nos músculos, podendo variar de 0 a 40%.[8]

Alguns relatórios sobre riscos associados à suplementação de creatina apontam possíveis efeitos adversos resultantes da sua ingestão, como incômodos gastrointestinais e aumento de peso (que pode ser indesejado para algumas pessoas). Casos isolados também sugerem possível desregulação das funções renais. No entanto, nenhum desses riscos se confirmaram em estudos clínicos sobre o tema. A SCF (*Scientific Committee on Food*), autoridade regulatória de alimentos na União Europeia, concluiu que a ingestão de 3 g de creatina por dia, não oferece risco para a saúde humana. Ressalva-se, ainda, que os dados existentes sobre esse assunto estão limitados à segurança da suplementação por atletas, pessoas adultas e ativas, sendo insuficientes em relação a pessoas com estilo de vida sedentário, fora da faixa etária e de grupos específicos como gestantes e lactantes.[8]

## **2.3 Métodos cromatográficos para determinação de creatina: uma breve revisão**

Com o aumento do comércio de suplementos e do interesse pela suplementação de creatina por atletas profissionais e amadores, diversos estudos vem propondo métodos para a determinação tanto do teor de princípio ativo quanto de contaminantes no controle de qualidade desses produtos.[11] Nesta seção, serão revisados aspectos de métodos propostos em trabalhos de validação de métodos para determinação de creatina, tanto em suplementos quanto em outras matrizes, com foco nos métodos cromatográficos.

Diversos métodos já foram desenvolvidos para quantificação de creatina em fluidos biológicos, alimentos e suplementos alimentares.[12–15] A creatina e a creatinina são importantes biomarcadores do funcionamento dos rins e do fígado, por isso abundam estudos sobre o desenvolvimento de métodos aplicáveis à bioquímica clínica.[16–18]

Entre os mais antigos e mais utilizados até hoje, destacam-se os métodos colorimétricos, baseados na execução de reações químicas ou enzimáticas e na determinação de produtos de reação pela medida de absorvância no espectro ultravioleta e visível.[13, 19, 20] Em geral, métodos desse tipo apresentam como limitação o fato de que no meio reacional complexo, envolvendo fluidos biológicos, não raro estão presentes substâncias capazes de interferir na medida instrumental.[21]

Desde a década de 1990, métodos cromatográficos vêm sendo desenvolvidos como alternativa para determinação de creatina em suplementos e em matrizes biológicas.[22] Esses métodos de separação por cromatografia líquida tem a vantagem de dispensar reações químicas ou enzimáticas, além de possibilitar a quantificação simultânea de creatina e outros compostos de importância biológica a ela relacionados, tais como creatinina e a fosfocreatina.[18]

### **2.3.1 Condições cromatográficas**

Detectores de diversos tipos são combinados com cromatografia para a identificação e quantificação de creatina. Os mais comuns são os detectores de UV-Vis, que detectam e quantificam o analito pela intensidade da absorvância em comprimentos de onda especificados. Geralmente, para creatina, são utilizados comprimentos de onda entre 205 e 220 nm.[21–23] No que diz respeito à diversidade de detectores, avanços significativos vem sendo promovidos por novos métodos que utilizam técnicas acopladas. Nesse sentido, pode-se mencionar, por exemplo, a cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas (LC-MS), que tem relevância em diversas áreas, tanto na clínica quanto no controle de qualidade de alimentos.[18, 24]

Entre os métodos baseados em HPLC para análise de creatina, existe um predomínio da cromatografia de fase reversa, utilizando colunas do tipo C18.[23, 25, 26] Colunas desse tipo são preenchidas com partículas de sílica cuja superfície é modificada por uma série de reações químicas que promovem a adição de cadeias alifáticas contendo 18 átomos de carbono, fazendo com que a fase estacionária adquira caráter apolar. Desse modo, na fase móvel podem ser utilizados solventes de alta polaridade e até mesmo eletrólitos aquosos. Uma desvantagem é que a interação com as fases móveis polares promove o desgaste da coluna, que precisa ser recuperada após cada série de análises.

Entre os métodos para determinação de creatina é relatado o uso de fases móveis variadas, tais como soluções de fosfato de potássio monobásico, sulfato de amônio ou água ultrapura.[18, 21, 22] No caso de soluções de sais de caráter alcalino, o pH é ajustado para um valor abaixo de 7, para favorecer a protonação da creatina durante a eluição. O meio ácido favorece a simetria do pico, mas não tem tanto efeito sobre o tempo de retenção.[22] Já foi mostrado que na faixa de pH entre 3 e 8 não há variação no tempo de retenção da creatina.[22]

A escolha do fluxo depende de vários fatores, que incluem o tipo de coluna, a composição da fase móvel e a resolução desejada, quando se trata de separação de misturas. Para quantificação de creatina, como único analito, ou simultaneamente a outros compostos, encontram-se valores que variam de 0,7 a 1,6 mL min<sup>-1</sup>. [21–23]

Quanto à temperatura, a estabilidade dessa condição na cromatografia líquida é importante para manter a reprodutibilidade do sinal analítico, já que variações de temperatura podem afetar a viscosidade da fase móvel. Os métodos desenvolvidos para quantificar creatina geralmente funcionam à “temperatura ambiente” ou a temperaturas máximas inferiores a 50 °C.[21, 23]

### **2.3.2 Parâmetros de validação**

Em geral, os métodos para quantificação por HPLC dependem da elaboração de curvas de calibração. Essas curvas são gráficos que ajustam a correlação entre duas variáveis a uma equação matemática. Os métodos desenvolvidos para creatina relatam a utilização do ajuste linear como o mais adequado, obtido por regressão linear simples

pelo método dos mínimos quadrados ordinários, assunto abordado detalhadamente na seção 2.4.[21, 23]

Em cromatografia, a concentração de analito pode ser correlacionada tanto com a área quanto com a altura do pico. Nos casos em que ocorre sobreposição de picos de difícil resolução, a altura pode ser utilizada como alternativa à medida da área. Essa alternativa é útil, pois, quando a resolução não é adequada, a medida da área fica comprometida, mas a altura é menos sensível a essa perturbação.[26] Outra possibilidade é a utilização da razão entre a área do pico do analito e área de um padrão interno, quando há um padrão interno disponível cujo pico seja bem resolvido no cromatograma.[21] Essa opção tem a vantagem de corrigir variações causadas por oscilações aleatórias de ordem técnica durante a eluição automática em série.

O preparo das soluções padrão também variam dependendo dos objetivos da técnica. Para determinação de creatina em fluidos corporais como urina e plasma sanguíneo, existe uma preferência pela calibração na presença de matriz.[24, 26] Já nas metodologias para controle de qualidade de suplementos, as soluções padrão são preparadas em água ultrapura ou na fase móvel, o que reproduz a forma de preparo utilizada pelos fabricantes para determinar os teores alegados nos rótulos.[26] Quanto à seletividade, não são aplicados testes que confirmem se efeitos de matriz existem ou não. Mais especificamente, nos estudos sobre métodos que se aplicam a suplementos, efeitos de matriz não são abordados.[21, 23]

Vários estudos alegam estabelecer uma faixa linear ampla desde concentrações abaixo de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  até  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Os trabalhos de Yue-Dong (1998) e de Dash e Sawhney (2002) asseguram a linearidade de 2 a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  e de 1 a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.[21, 22] No entanto, ambos não especificam todos os níveis de concentração utilizados no procedimento. Feizi e colaboradores (2022) realizaram a calibração com 7 pontos (1, 5, 10, 30, 50, 80,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e asseguram linearidade em toda a faixa testada.[23] Persky e colaboradores (2003), por sua vez, realizaram a calibração com 8 pontos, incluindo entre eles o branco (0, 1, 5, 10, 25, 50, 75,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), mas asseguram linearidade na faixa entre 1 e  $75 \text{ mg L}^{-1}$ . [26]

Esses exemplos trabalham com condições cromatográficas similares e detectores de UV-Vis. Observa-se a distribuição heterogênea dos níveis de concentração na curva de calibração, com pontos notavelmente mais próximos abaixo de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e pontos mais afastados acima desse nível. Esse tipo de construção poderia favorecer a

identificação de faixas lineares mais largas, mascarando possíveis desvios da linearidade e incluindo pontos que possivelmente deveriam estar fora da faixa de trabalho.

Ademais, Boenzi e colaboradores (2011), trabalhando com espectrômetro de massas acoplado ao HPLC, foram os que identificaram a faixa linear mais larga, de 0,05 (seu limite de quantificação) até 200 mg L<sup>-1</sup>. Sua calibração foi realizada com 8 pontos, a saber 0,05; 0,5; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Nesse caso, há uma variação crescente ainda mais pronunciada na distância entre os níveis de concentração mais altos, o que não seria o mais recomendado. Essas publicações avaliam a qualidade do ajuste pelos coeficientes de determinação,  $r^2$ , e não apresentam testes de hipóteses para as premissas da regressão linear.[18]

Na determinação dos limites de detecção e de quantificação, observa-se uma preferência pelo procedimento que consiste na análise de diluições sucessivas, utilizando a relação sinal/ruído (S/N) como critério de tolerância. Geralmente, para os limites de quantificação e de detecção são estabelecidos como critérios, respectivamente,  $S/N \geq 10$  e  $S/N \geq 3$ . [18, 24] Além disso, é comum encontrar o menor nível da curva analítica sendo considerado o limite de quantificação.[23] A determinação e confirmação desses limites são especialmente relevantes quando se trata de métodos aplicados à determinação de analitos em concentrações muito baixas, como é o caso da análise de creatina em fluidos corporais.

Por fim, “exatidão” e precisão são parâmetros abordados por todos os estudos sobre validação e desenvolvimento de métodos. Especialmente na área clínica, observa-se uma preferência pela utilização de matrizes brancas fortificadas, comparando-se a concentração adicionada com o valor predito pela equação obtida por regressão linear.[18, 24]

Especificamente sobre os métodos aplicados no controle de qualidade de suplementos, Dash e Sawhney (2002) avaliam a repetibilidade pela análise de quatro replicatas em seis níveis de concentração diferentes no mesmo dia. Além disso, as mesmas soluções são analisadas em dias diferentes ao longo de 28 dias. Para determinar a exatidão, os autores analisam quatro amostras controle, sete vezes, ao longo de 28 dias.[21] Feizi e colaboradores (2022), por sua vez, acessam a precisão e a exatidão pela comparação entre o valor predito pela curva de calibração e o valor nominal de cada solução padrão utilizada na construção da curva de calibração, nas concentrações 5, 30 e 50 mg L<sup>-1</sup>. [23] Em ambos os estudos, tanto a precisão quanto a exatidão são expressas em termos de desvio padrão relativo.

Ressalva-se que os estudos exemplificados nessa breve revisão provêm de periódicos internacionais, foram produzidos em lugares variados e publicados em épocas distintas ao longo de duas décadas. Além disso, os objetivos e as aplicações pretendidas para os métodos desenvolvidos são variados. Portanto, como o processo de validação não é restrito a uma única forma possível de ser executado, já seria esperado que houvesse semelhanças e diferenças.

Nos estudos levantados, poderiam ser questionados alguns aspectos, como a distribuição heterogênea dos pontos na curva de calibração e a ausência de testes de hipóteses para as premissas da regressão linear, assunto que será abordado a seguir. Na próxima seção, serão detalhados os parâmetros de validação adotados neste trabalho, tendo como base as orientações de órgãos oficiais brasileiros.

## **2.4 Validação de métodos analíticos**

Um método analítico é considerado validado quando é atestada a confiabilidade de seus resultados, segundo critérios padronizados estabelecidos por orientações de órgãos oficiais.[5] No Brasil, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) são exemplos de autoridades responsáveis pelas diretrizes oficiais dos processos de validação. Orientações sobre validação também podem ser produzidas por outros órgãos reguladores como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.[27]

Este trabalho adota como base a orientação para validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 de 2020 do INMETRO.[5] Como fonte complementar também adota-se o Manual de garantia de qualidade analítica do MAPA.[27] Na terminologia desses documentos, em consonância com as convenções de instituições científicas internacionais, no processo de validação de métodos analíticos quantitativos devem ser verificados os parâmetros: linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação e precisão. O parâmetro robustez permanece opcional.

### **2.4.1 Linearidade**

Em se tratando de métodos quantitativos de análise química, linearidade é a capacidade que um método apresenta de gerar medidas, dentro de uma faixa de trabalho, que sejam diretamente proporcionais à concentração de analito. Nesse sentido, a faixa

linear de trabalho é o intervalo entre a menor e a maior concentração de analito no qual o método validado gera respostas diretamente proporcionais, de modo que as medições devem ocorrer obrigatoriamente dentro dessa faixa.[5]

Antes de proceder ao ajuste linear, recomenda-se a aplicação de testes para identificação de valores anômalos (*outliers*). Neste trabalho será utilizado o teste de Grubbs, no qual a estatística  $G$  é calculada como a razão entre a distância de uma medida ( $x$ ) até a média das repetições ( $\bar{x}$ ) e o desvio padrão ( $s$ ), conforme a Eq. 1. O  $G_{\text{calc}}$  é comparado a um  $G_{\text{crít}}$  tabelado, considerando o grau de liberdade e o nível de confiança desejado. Se o  $G_{\text{calc}}$  for maior do que o  $G_{\text{crít}}$ , então o valor avaliado é considerado anômalo e deve ser rejeitado.

$$G = \frac{x - \bar{x}}{s} \quad \text{Eq.1}$$

A linearidade é medida pelo grau de correlação linear entre duas variáveis. A regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados é o procedimento matemático mais usual para determinar essa correlação a partir de dados experimentais. Duas variáveis são linearmente correlacionadas quando a associação entre elas pode ser modelada como uma reta do tipo representado pela Eq. 2.

$$y = bx + a \quad \text{Eq. 2}$$

Na Eq. 2,  $y$  é o sinal obtido como resposta, nesse caso a área do pico, e  $x$  é a concentração de analito em uma amostra. Os termos  $b$  e  $a$  correspondem aos coeficientes angular e linear de uma reta e podem ser obtidos, respectivamente, pelas equações 3 e 4.[27, 28]

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Eq. 3}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo:

$x_i$  = valores individuais de concentração de cada solução padrão

$y_i$  = valores individuais de sinal instrumental medido para cada solução padrão

$\bar{x}$  = média dos valores de x (concentração)

$\bar{y}$  = média dos valores de y (resposta)

Sendo assim, uma curva de calibração consiste no ajuste linear de dados experimentais, e pode ser obtida a partir da medição de soluções padrão, isto é, com concentrações conhecidas de analito. É recomendável que a calibração seja realizada em pelo menos cinco níveis de concentração uniformemente distribuídos ao longo da faixa de trabalho, e que em cada nível de concentração sejam feitas pelo menos três repetições.[5] Uma vez realizado o ajuste linear, a concentração desconhecida de analito em uma amostra aleatória pode ser calculada pela Eq. 2, considerando a resposta medida.

O método dos mínimos quadrados recebe esse nome pois tem como princípio a minimização os resíduos de regressão.[28] Em uma correlação linear ideal, o sinal observado corresponderia exatamente ao valor calculado pela equação, e os pares ordenados (concentração, sinal) gerariam pontos que coincidiriam exatamente com a reta. Na prática, no entanto, essa coincidência não acontece, mas em cada nível de concentração, o valor médio das repetições deve se aproximar do valor predito pela regressão. A diferença entre um sinal observado e o respectivo valor predito é o que se denomina resíduo de regressão.

O método dos mínimos quadrados ordinários assume que os resíduos de regressão são aleatórios, independentes e normalmente distribuídos, com média  $\mu = 0$  e variância  $\sigma^2$  constante em todos os níveis de concentração.[28] Na prática, os resíduos devem apresentar um valor médio que seja próximo de zero e variâncias que possam ser consideradas iguais, em um determinado nível de confiança, em toda a faixa linear. Considerando essas premissas do modelo de regressão, são adotados testes de hipóteses para verificar se os resíduos são de fato homocedásticos, independentes e normalmente distribuídos.

#### **2.4.1.1 Homocedasticidade**

Um conjunto de dados experimentais é considerado homocedástico quando as variâncias não apresentam diferença significativa em um determinado nível de confiança.[4, 29] Há vários testes disponíveis para verificação dessa característica.

Citam-se aqui três exemplos, os quais são recomendados pelos documentos de referência adotados.[5, 27]

Em primeiro lugar, a homocedasticidade pode ser testada por um teste F, no qual o  $F_{calc}$  é dado pela razão entre a maior e a menor variância, conforme a Eq. 5. Quando o valor calculado é menor do que o valor crítico, os dados são considerados homocedásticos.[27]

$$F_{calc} = \frac{s^2_{max}}{s^2_{min}} \quad \text{Eq. 5}$$

O valor crítico  $F_{crit}$  é encontrado em uma tabela de distribuição F-Snedecor, considerando o nível de significância ( $\alpha$ ) desejado e os graus de liberdade ( $n - 1$ ) da maior e da menor variância, respectivamente. Neste trabalho, será adotado sempre  $\alpha = 0,05$ , que corresponde a um nível de significância de 5%.

Em segundo lugar, o teste de Cochran é parecido com um teste F. No entanto, a estatística discriminante C consiste na razão entre a maior variância e o somatório das variâncias, conforme a Eq. 6. O valor crítico é tabelado e depende do nível de significância adotado e do número de repetições.[27] Assim como no teste F, os dados são considerados homocedásticos se a estatística  $C_{calc}$  for menor que o valor crítico tabelado.

$$C_{calc} = \frac{s^2_{max}}{\sum s^2_i} \quad \text{Eq. 6}$$

Em terceiro lugar, o teste de Levene-Brown-Forsythe, ou teste de Levene modificado, divide o conjunto dos resíduos em dois grupos simétricos. Caso o conjunto tenha uma quantidade ímpar de dados, exclui-se o valor central. Na prática, quando se trabalha com um número ímpar de níveis de concentração, exclui-se o nível médio. Calculam-se os desvios absolutos dos resíduos em relação à mediana de seu grupo e os desvios médios de cada grupo. Calcula-se a variância agrupada, a qual consiste na soma dos quadrados dos desvios de ambos os grupos dividido pelo grau de liberdade, dado por  $n_{G1} + n_{G2} - 2$ , conforme a Eq. 7. Por fim, a estatística  $t_L$  é calculada pela Eq. 8.[27]

$$s_p^2 = \frac{\sum d_{i,1}^2 + \sum d_{i,2}^2}{n_{G1} + n_{G2} - 2} \quad \text{Eq. 7}$$

$$t_{L,calc} = \frac{|d_{m1} - d_{m2}|}{\sqrt{s_p^2 \left( \frac{1}{n_{G1}} + \frac{1}{n_{G2}} \right)}} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde,

$d_{m1}$  e  $d_{m2}$  são os desvios médios de cada grupo;

$s_p^2$  é a variância agrupada;

$n_{G1}$  e  $n_{G2}$  são as quantidades de dados em cada grupo.

O valor calculado  $t_{L,calc}$  é comparado com um  $t_{crítico}$  da distribuição *t-Student* com nível de significância  $\alpha$  e graus de liberdade  $n_{G1} + n_{G2} - 2$ . Se o valor calculado for menor que o valor crítico, os dados são considerados homocedásticos.[27]

#### 2.4.1.2 Independência

O teste mais comum para determinação da independência dos resíduos é o teste de Durbin-Watson.[4, 27] Calcula-se a diferença entre cada resíduo e o seu anterior. A estatística  $d$  consiste na razão entre a soma dos quadrados das diferenças e a soma dos quadrados dos resíduos, conforme a Eq. 9.

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad \text{Eq. 9}$$

A estatística  $d$  assume valores entre 0 e 4, sendo que a independência é assegurada quando  $d$  converge para 2. O afastamento do valor da estatística  $d$  de 2 para 0 ou para 4 indica aumento da autocorrelação, sendo que  $d = 0$  indica perfeita autocorrelação positiva, e  $d = 4$  indica perfeita autocorrelação negativa.[29]

De maneira simplificada, pode-se aceitar que os dados são independentes quando  $d \geq 1,5$ .[27] Com mais rigor, determinam-se os limites mínimo e máximo,  $d_L$  e  $d_U$ , respectivamente. Se o valor de  $d$  estiver entre esses limites, o teste é inconclusivo. Valores de  $d$  menores que  $d_L$  indicam autocorrelação, e valores de  $d$  maiores que  $d_U$  indicam

independência dos resíduos.[29] Com nível de significância de 5%,  $d_L$  e  $d_U$  podem ser calculados pelas equações 10.1 e 10.2.[29]

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad \text{Eq. 10.1}$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad \text{Eq. 10.2}$$

### 2.4.1.3 Normalidade

A normalidade pode ser verificada por diversos testes, entre eles os mais comuns são os testes de Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov.[30] Neste trabalho, adota-se o teste de Anderson-Darling.[27, 31, 32] Nesse teste, os resíduos são ordenados em ordem crescente, e calcula-se a probabilidade acumulada do resíduo padronizado, conforme a Eq. 11.

$$p_i = P \left\{ \frac{e^{(i)} - \bar{e}}{\sigma_e} \right\} \quad \text{Eq. 11}$$

Calculam-se, então, as quantidades  $h_i$ , pela Eq. 12.

$$h_i = (2i - 1) [\ln(p_{(i)}) + \ln(1 - p_{N+1-(i)})] \quad \text{Eq. 12}$$

Na Eq. 12,  $p_{N+1-(i)}$  é a probabilidade acumulada do resíduo na  $i$ -ésima posição da ordem inversa. Por exemplo, se  $p_{(i)}$  é a probabilidade acumulada do segundo menor resíduo,  $p_{N+1-(i)}$  é a probabilidade acumulada do segundo maior resíduo.

Por fim, calcula-se  $AA$ , pela Eq. 13, na qual  $N$  é o número de resíduos e  $\bar{h}$  é a média das quantidades  $h_i$  calculadas. Alguns trabalhos também denominam a estatística  $A = -N - \bar{h}$ . [27] O p-valor do teste é calculado por uma das equações 14.1 a 14.4, dependendo do valor de  $AA$ . [31] Se o p-valor for maior que 0,05 (adotando-se nível de significância de 5%), os dados são considerados normalmente distribuídos. Caso contrário, os dados não podem ser considerados normais, no nível de significância especificado. [27, 32]

$$AA = \left( 1 + \frac{0,75}{N} + \frac{2,25}{N^2} \right) (-N - \bar{h}) \quad \text{Eq. 13}$$

$$\text{se } AA < 0,2; \text{ p-valor} = 1 - \exp[-13,436 + 101,14(AA) - 223,73(AA^2)] \quad \text{Eq. 14.1}$$

$$\text{se } 0,2 \leq AA < 0,34; \text{ p-valor} = 1 - \exp[-13,436 + 101,14(AA) - 223,73(AA^2)] \quad \text{Eq. 14.2}$$

$$\text{se } 3,4 \leq AA < 0,6; \text{ p-valor} = \exp[0,9177 - 4,279(AA) - 1,38(AA^2)] \quad \text{Eq. 14.3}$$

$$\text{se } AA \geq 0,6; \text{ p-valor} = \exp[1,2937 - 5,709(AA) + 0,0186(AA^2)] \quad \text{Eq. 14.4}$$

## 2.4.2 Seletividade

A seletividade consiste na capacidade que um método analítico apresenta para diferenciar o analito de outras substâncias químicas que possam estar presentes na matriz, ou que possam ser adicionados durante o procedimento de análise. Portanto, esse parâmetro consiste em verificar, entre outros aspectos, se há efeito de matriz significativo.[5]

A verificação da seletividade pode ser feita de diversas maneiras. Neste trabalho, essa verificação será feita pela comparação entre curvas de calibração externa e interna. A calibração externa é feita com soluções padrão na ausência de matriz. Já na calibração interna preparam-se as soluções padrão, com concentrações conhecidas de analito adicionadas a uma concentração constante de amostra. De tal modo, pode-se observar se existe diferença significativa no sinal instrumental na presença e na ausência de matriz.[5]

O procedimento a ser adotado varia dependendo da disponibilidade de matriz sem analito. Caso a matriz sem o analito esteja disponível, preparam-se dois grupos de soluções padrão, um com a matriz e outro sem. De tal modo, são obtidas curvas de calibração matrizadas e não matrizadas. Aplicam-se os testes *F-Snedecor* e *t-Student* às variâncias e às médias, respectivamente, em pelo menos três níveis de concentração (alto, médio e baixo). Se o teste *F* não for significativo, a matriz não causa efeito na precisão, por nível de concentração; e se o teste *t* não for significativo, a matriz não causa efeito sobre o resultado, por nível de concentração.[5]

Alternativamente, caso a matriz sem analito não esteja disponível, recomenda-se a preparação de duas curvas analíticas, uma com soluções padrão na ausência de matriz, e outra com soluções padrão às quais são adicionadas iguais quantidades de amostra (matriz com analito). Por meio de um teste *t-Student*, comparam-se os coeficientes angulares das duas curvas. Se os coeficientes angulares não diferirem significativamente, conclui-se que não há efeito de matriz. Caso contrário, havendo diferença significativa entre as inclinações comparadas, conclui-se que há efeito de matriz, e as curvas analíticas devem ser preparadas na matriz.[5]

A saber, o presente trabalho trata-se de um caso em que não há disponibilidade de matriz sem analito. Por isso, a avaliação da seletividade será feita por meio da comparação da inclinação de curvas preparadas na presença e na ausência de amostra, conforme será descrito no capítulo 3. Esse tipo de estudo se fundamenta na possibilidade de que a presença de interferente pode acentuar ou inibir a detecção ou quantificação do analito de interesse.[5]

### **2.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação**

De maneira simplificada, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) podem ser determinados pelas equações 15 e 16.

$$LD = 3,3 * \frac{s}{b} \quad \text{Eq. 15}$$

$$LQ = 10 * \frac{s}{b} \quad \text{Eq. 16}$$

Nas duas equações,  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica, e  $s$  é o desvio padrão do branco, ou, na ausência de sinal do branco, o desvio padrão do menor nível de concentração.[5] Ressalva-se que esse procedimento tende a estimar limites acima dos reais para concentrações mais altas do que no nível de traços.[5] Essa limitação, no entanto, não é empecilho ao método estudado, considerando a sua aplicação à análise de amostras comerciais de suplementos de creatina, cujos rótulos, em geral, alegam um teor de 100%, e as diluições de amostras são preparadas estimando-se uma concentração próxima ao centro da faixa linear.

### **2.4.4 Tendência/Recuperação**

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre os resultados fornecidos pelo método e os valores tidos como verdadeiros. Um valor tido como verdadeiro pode ser, por exemplo, o teor de analito de um Material de Referência Certificado (MRC). Alternativamente, podem ser adotados padrões de analitos com teores validados e assumidos como verdadeiros. Além disso, quando existem métodos oficiais, a exatidão pode ser avaliada pela conformidade entre os resultados obtidos pelo método validado e por um método oficial.[5]

Na terminologia da DOQ-CGCRE-008/2020 do INMETRO, a exatidão é avaliada numericamente pela tendência, e a tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida pela Eq. 17. Para avaliar a tendência, podem ser utilizados as mesmas soluções padrão utilizadas como replicatas para construção das curvas de calibração, e confrontá-los com os valores preditos pela equação de regressão.[5]

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} * 100 \quad \text{Eq.17}$$

#### **2.4.5 Precisão**

A precisão refere-se ao grau de dispersão dos resultados gerados por um método analítico. A medida numérica da precisão é o desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV), que consiste na razão do desvio padrão ( $s$ ) pela concentração média determinada ( $CMD$ ), conforme a Eq. 18.[5]

$$\text{DPR}(\%) = \text{CV} = \frac{s}{\text{CMD}} * 100 \quad \text{Eq. 18}$$

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo, é descrito o método a ser validado, adaptado da proposta de Dash e Sawhney (2002).[21] Além disso, são descritos os materiais e os procedimentos adotados na verificação de cada parâmetro de validação.

#### **3.1 Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo LC-2030 *Plus Prominence*, com detector de UV-Vis e comprimento de onda fixado em 205 nm. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40°C, e a da célula, a 35°C. Adotou-se uma taxa de fluxo de 0,75 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção automática de 10 µL.

Como fase móvel foi utilizada solução de sulfato de amônio a 0,045 mol L<sup>-1</sup>. A fase estacionária consiste em uma coluna Hyperclone<sup>TM</sup> de fase reversa, com dimensões 150 x 4,6 mm, preenchida com partículas de sílica de 5 µm de diâmetro, recobertas com cadeias de octadecilsilano (C18, ODS).

#### **3.2 Preparo da fase móvel**

A solução de sulfato de amônio a 0,045 mol L<sup>-1</sup> foi preparada dissolvendo 5,9463 g do reagente sólido em água ultrapura e diluindo para 1000 mL em balão volumétrico.

#### **3.3 Preparo das soluções estoque e das curvas de calibração**

Uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de creatina monoidratada foi preparada dissolvendo-se 25,0 mg de padrão do analito em água ultrapura em um béquer submetido a ultrassom, sem aquecimento, por 5 min. A solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25,0 mL, e completou-se o volume com água ultrapura. Submeteu-se a solução a ultrassom, novamente, por 10 min. Diluições foram preparadas conforme esquematizado na Tabela 1, transferindo-se alíquotas da solução estoque para balões de 10 mL.

Por fim, alíquotas foram transferidas para *vials* de 2 mL e analisadas conforme as condições cromatográficas supracitadas. Para cada nível de concentração foram preparadas três diluições independentes. Além disso, todo o procedimento foi repetido em dias diferentes para obter três curvas de calibração independentes.

**Tabela 1** - Preparo da curva de calibração externa

Nível	V <sub>balão</sub> (mL)	V <sub>SE</sub> (mL)	Concentração aprox. (mg L <sup>-1</sup> )
1	10	0,2	20,0
2	10	0,4	40,0
3	10	0,6	60,0
4	10	0,8	80,0
5	10	1	100,0

Para a calibração interna, uma solução estoque com concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> de suplemento de creatina foi preparada dissolvendo-se 25,0 mg de amostra, aleatória e desidentificada, em água ultrapura em um béquer submetido a ultrassom sem aquecimento por 5 min. A solução foi transferida quantitativamente para balão de 25,0 mL, e completou-se o volume com água ultrapura. Submeteu-se a solução a ultrassom, novamente, por 10 min. As diluições para a curva de calibração interna foram preparadas conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** - Preparo da curva de calibração interna

Nível	V <sub>balão</sub> (mL)	V <sub>SE</sub> (mL)	V <sub>amostra</sub> (mL)	Adição (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração final (mg L <sup>-1</sup> )
1	10	0,125	0,250	12,5	37,5
2	10	0,250	0,250	25,0	50,0
3	10	0,375	0,250	37,5	62,5
4	10	0,500	0,250	50,0	75,0
5	10	0,625	0,250	62,5	87,5

Por fim, alíquotas foram transferidas para *vials* de 2 mL e analisadas conforme as condições cromatográficas supracitadas. Para cada nível de concentração foram preparadas três diluições independentes. Três curvas de calibração foram obtidas, reproduzindo-se o mesmo experimento em dias diferentes.

### 3.4 Avaliação da linearidade

Primeiramente, foram excluídos os valores aberrantes identificados pelo teste de Grubbs. Em seguida, executou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados utilizando o Microsoft Excel. Os resíduos de regressão foram calculados e analisados pelos testes de Anderson-Darling, Durbin-Watson e Levene-Brown-Forsythe, para verificação da normalidade, da independência e da homocedasticidade, respectivamente. A título de comparação, a homocedasticidade também foi verificada pelo teste de Cochran e pelo teste F.

### **3.5 Avaliação da seletividade**

Para verificar a seletividade do método estudado, compararam-se os coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas com adição de amostra e sem adição de amostra. Assim como descrito na avaliação da linearidade, executou-se a regressão linear para obter as curvas de calibração interna. Compararam-se os coeficientes angulares das curvas de calibração externa e interna por meio do teste F e do teste t, a um nível de significância de 5%. Os cálculos de ambos os testes foram realizados utilizando o Microsoft Excel.

### **3.6 Estimação dos limites de detecção e de quantificação**

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados com base nos parâmetros das curvas de calibração. Para cada curva, estimaram-se os respectivos limites, utilizando o coeficiente angular e o desvio padrão do menor nível de concentração conforme as equações 15 e 16.

### **3.7 Análise da tendência/recuperação**

As soluções padrão de 20, 60 e 100 mg L<sup>-1</sup> das três curvas de calibração externa foram agrupadas, obtendo n = 9 por nível de concentração. As equações obtidas por regressão foram utilizadas para calcular as concentrações a partir das respectivas respostas. As recuperações alcançadas foram calculadas pela Eq. 17. Por fim, os valores foram avaliados com base nos limites estabelecidos pela AOAC e adotados nas orientações do INMETRO.[5]

### **3.8 Análise da precisão**

A precisão do método foi avaliada a nível de repetibilidade. Utilizando as mesmas análises relatadas na seção 3.7, determinou-se o desvio padrão relativo da recuperação por nível de concentração. Compararam-se, então, os valores calculados com os limites estipulados pela AOAC e adotados na orientação do INMETRO.[5]

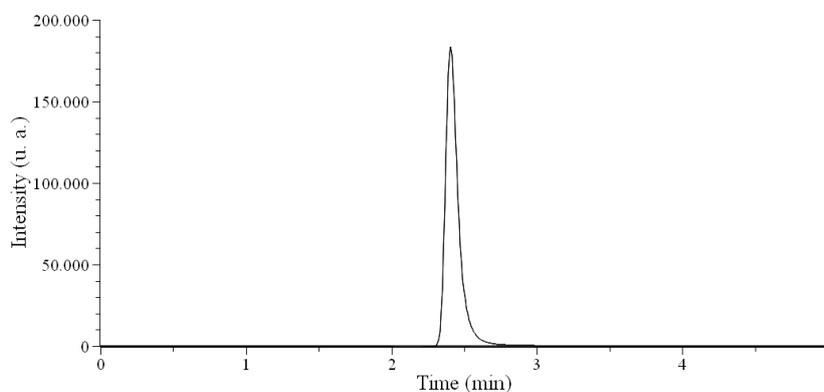
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prossegue-se, agora, para os resultados dos testes de cada parâmetro de validação e dos respectivos testes estatísticos. Os resultados são discutidos considerando as recomendações oficiais e a literatura específica. As planilhas de cálculos e os dados brutos podem ser visualizados [aqui](#).

### 4.1 Linearidade

O resultado da análise cromatográfica é um gráfico de intensidade por tempo, denominado cromatograma. A Figura 4 mostra o cromatograma obtido como resultado da análise de uma solução padrão de 20 mg L<sup>-1</sup>, na calibração externa. Desse gráfico são extraídas várias informações. A primeira delas é o tempo de retenção ( $t_R$ ), que corresponde ao tempo em que o pico tem intensidade máxima. Nesse caso, o  $t_R$  da creatina é 2,46 minutos. O  $t_R$  é um indicador da estabilidade da análise, já que, mantendo-se as mesmas condições cromatográficas, a cada repetição o mesmo analito deve apresentar um único  $t_R$ .

**Figura 4** - Cromatograma de uma solução padrão de creatina monoidratada a 20 mg L<sup>-1</sup> na calibração externa



No cromatograma, a área do pico e a altura são as duas grandezas proporcionais à concentração do analito. Conforme será visto no parâmetro seletividade, não há substâncias a serem consideradas que interfiram no resultado da análise cromatográfica da creatina. Por isso, neste trabalho, a calibração é feita pela área.

Os resultados das análises das soluções padrão, utilizados para construção das curvas de calibração, são apresentados na Tabela 3. Os valores marcados com (\*) foram considerados anômalos pelo teste de Grubbs.

**Tabela 3-** Resultados das medidas para as curvas de calibração externa

Curva	Nível	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Área (u. a.)
1	1	20,0	1076980
	1	20,0	1100952
	1	20,0	1094229
	2	40,0	1961781
	2	40,0	1945613
	2	40,0	1939194
	3	60,0	2770602
	3	60,0	2764628
	3	60,0	2761389
	4	80,0	3603776
	4	80,0	3602391
	4	80,0	*3541028
	5	100,0	4371900
	5	100,0	4362737
	5	100,0	*4093629
2	1	20,2	1146186
	1	20,2	1149058
	1	20,2	1154402
	2	40,5	2052639
	2	40,5	2050054
	2	40,5	2055612
	3	60,7	2937798
	3	60,7	2934236
	3	60,7	*2897722
	4	81,0	3769058
	4	81,0	3760498
	4	81,0	3750373
	5	101,2	4622507
	5	101,2	4627709
	5	101,2	4594101
3	1	20,4	1135069
	1	20,4	1117545
	1	20,4	1138040
	2	40,8	1925771
	2	40,8	1955617
	2	40,8	1965897
	3	61,2	2858906
	3	61,2	2823995

Continua na página seguinte

**Tabela 3** – Resultados das medidas para as curvas de calibração externa (continuação)

Curva	Nível	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Área (u. a.)
	3	61,2	2839072
	4	81,6	3666950
	4	81,6	3635519
3	4	81,6	3655531
	5	102,0	4422702
	5	102,0	4438925
	5	102,0	*4262539

Após a eliminação dos valores anômalos das medidas de área identificados pelo teste de Grubbs, realizou-se o ajuste dos dados aplicando a regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Como resultados do ajuste, foram obtidos os respectivos coeficientes angulares (inclinações) e lineares (interceptos), apresentados na Tabela 4. Na mesma tabela são apresentados os coeficientes de determinação  $r^2$ .

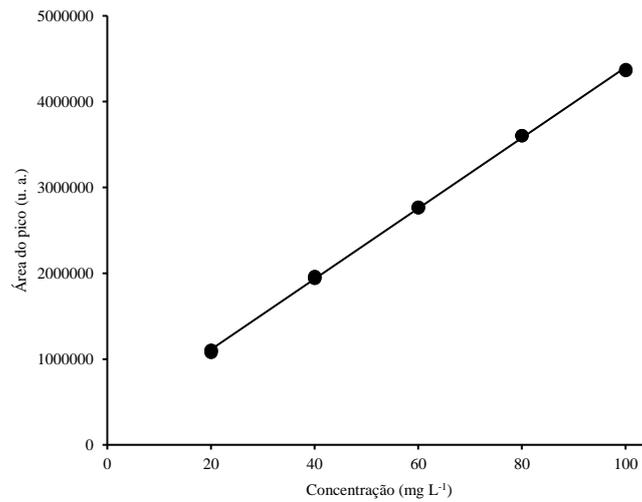
**Tabela 4** - Parâmetros de regressão obtidos em cada calibração externa

Curva	Inclinação	Intercepto	$r^2$
1	41102	289417	0,9996
2	42673	309206	0,9998
3	41204	282638	0,9891

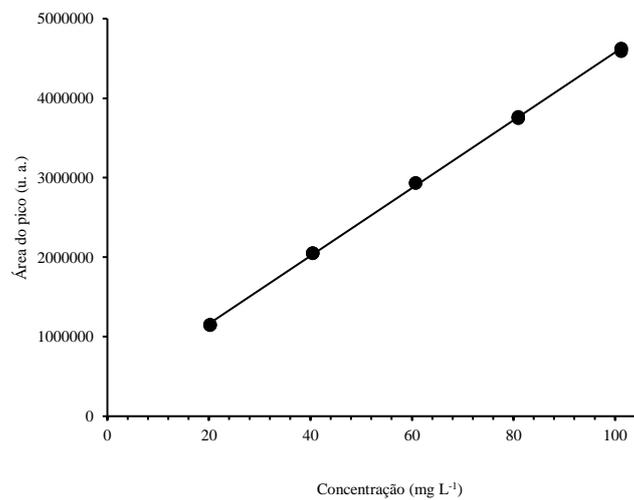
Pela análise dos coeficientes de determinação, as três curvas seriam consideradas adequadas ao ajuste linear, com  $r^2 > 0,98$ . Por esse critério, a linearidade poderia ser assegurada na faixa testada, de 20 a 100 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, segundo a orientação DOQ-CGCRE-008/2020 do INMETRO, o coeficiente de determinação “é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Desse modo, devem ser avaliados os resíduos para verificar essa adequação.”[5]

Sendo assim, procedeu-se à análise dos resíduos de regressão. Os gráficos apresentados da Figura 5 à Figura 7 exibem a dispersão dos pontos medidos em cada calibração e a linha de tendência obtida pelo ajuste, no intervalo de concentração testado. Por sua vez, os gráficos mostrados da Figura 8 à Figura 10 exibem a dispersão dos resíduos.

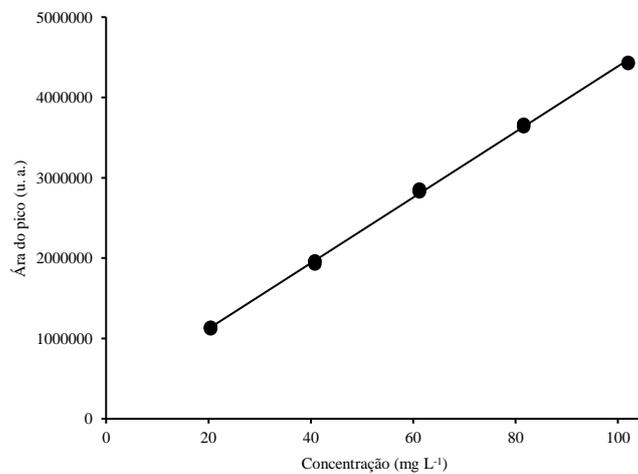
**Figura 5** - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 1,  $y = 41102x + 289416$



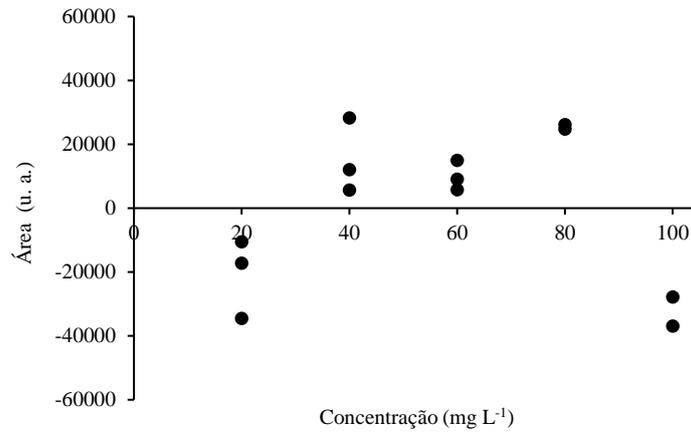
**Figura 6** - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 2,  $y = 42672x + 309205$



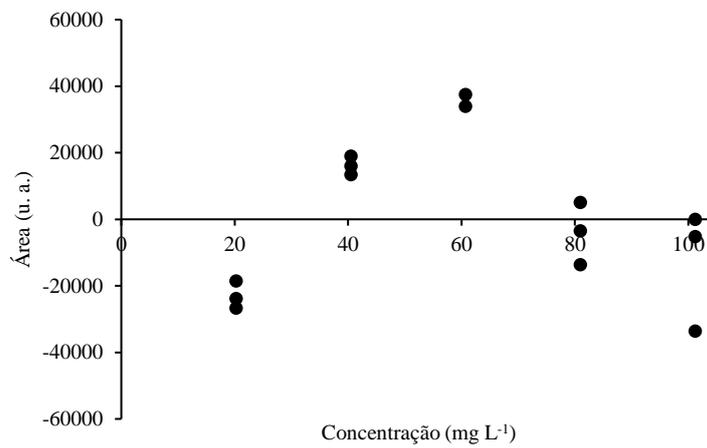
**Figura 7** - Gráfico de dispersão dos pontos da curva 3,  $y = 41204x + 282638$



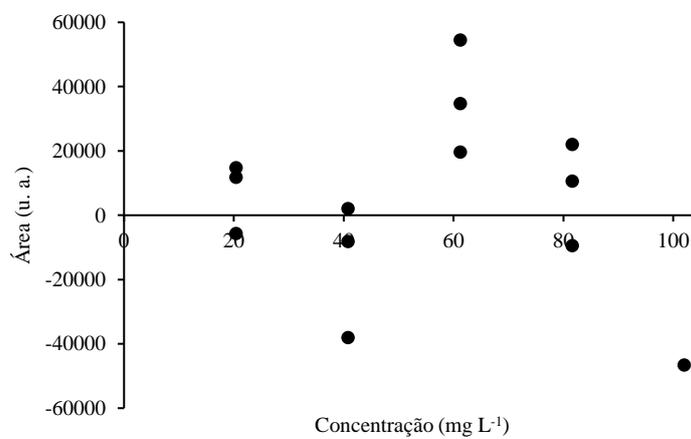
**Figura 8** - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 1



**Figura 9** - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 2



**Figura 10** - Dispersão dos resíduos de regressão da curva 3



A análise visual das curvas de calibração não parece evidenciar qualquer desvio da linearidade na faixa de trabalho adotada. Entretanto, a análise visual dos resíduos de regressão não possibilita identificar com segurança padrões aleatórios de dispersão, o que poderia ser um indício de inadequação ao modelo. Segue-se então para os testes de hipóteses que verificam a adequação dos resíduos às premissas da regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários: homocedasticidade, independência e normalidade.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos testes de homocedasticidade dos resíduos das três curvas de calibração, a um nível de significância de 5%. Será considerado para a validação o resultado do teste de Levene. Os demais testes são apresentados para comparação e discussão das divergências e convergências que podem haver entre eles.

**Tabela 5 - Resultados dos testes de homocedasticidade**

Curva	Teste F		Teste de Cochran		Teste de Levene	
	F <sub>calc</sub>	F <sub>crít</sub>	C <sub>calc</sub>	C <sub>crít</sub>	t <sub>L</sub>	t <sub>crít</sub>
1	159,4	199,5	0,433		1,888	2,306
2	51,6	199,5	0,733	0,684	2,209	2,228
3	3,5	19	0,348		1,529	2,262

O teste de Cochran considerou os dados de uma das curvas heterocedásticos,  $C_{calc} > C_{crít}$ , divergindo dos demais testes. Ressalva-se que esse teste não se adequa quando os conjuntos de dados comparados não apresentam o mesmo tamanho. Devido aos valores anômalos excluídos, a quantidade de replicatas contadas nos testes variam entre 3 e 2.

Além disso, nota-se que essa pequena diferença tem uma grande consequência na determinação dos valores críticos. No teste F, com 5% de significância, quando o grau de liberdade da maior variância se mantém ( $n = 3$ ), e o da menor variância diminui para 1 ( $n = 2$ ), devido à exclusão de um valor anômalo, o valor crítico passa de 19 para 199. Essa diferença torna o teste mais tolerante, aumentando a chance de aceitar a hipótese de homocedasticidade. Isso deve-se ao fato de que testes desse tipo são sensíveis ao número de replicatas. Por esse motivo, o aumento da quantidade de repetições por nível de concentração aparece como uma recomendação nas orientações oficiais.

O teste de Levene-Brown-Forsythe é sabidamente mais tolerante, tendendo a aceitar a hipótese de homocedasticidade quando os demais testes a rejeitam, mas o seu poder de teste é adequado ao rigor deste trabalho.[27] No geral, considerando os três testes em

conjunto, conclui-se que, com um nível de confiança de 95%, o método apresentou variância homogênea ao longo de toda a faixa de trabalho testada, e os dados podem ser considerados homocedásticos.

Os resultados do teste Durbin-Watson, aplicado para verificação da independência dos resíduos, são apresentados na Tabela 6. Nota-se que nas três curvas, não há evidência de que os resíduos sejam independentes a um nível de confiança de 95%. Nas duas primeiras, o teste conclui que existe correlação entre os resíduos ( $d < d_L$ ), e na terceira o teste é inconclusivo ( $d_L < d < d_U$ ).

**Tabela 6 - Resultados do teste de Durbin-Watson**

Curva	d	dL	dU
1	1,0059	1,012	1,339
2	0,6067	1,046	1,349
3	1,1989	1,080	1,360

A evidência de correlação entre os resíduos é um indício de inadequação do ajuste linear, sugerindo de pode haver perda da linearidade em algum ponto da faixa de trabalho testada. Tal inconsistência poderia ser resolvida simplesmente aumentando o número de repetições, já que o teste de hipóteses é sensível à quantidade de dados. Pode-se sugerir, ainda, testar uma faixa de trabalho mais estreita, em concentrações mais baixas. Essas, no entanto, são questões em aberto, que ficam como sugestões para verificação futura.

A sugestão de testar uma faixa linear diferente não necessariamente contraria trabalhos como o de Dash e Sawhney (2002) e outros citados, que serviram de base para o método estudado e asseguram linearidade até  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , já que o resultado da validação pode ser diferente no contexto de cada laboratório. Essa variação é previsível devido à utilização, por exemplo, de diferentes cromatógrafos, colunas e detectores. É por isso que um dos objetivos da validação é também adequar o método às condições específicas do laboratório onde ele será executado.

Os resultados da verificação da premissa de normalidade pelo teste de Anderson-Darling estão apresentados na Tabela 7. Nas três curvas preparadas, o teste levou a concluir que os resíduos são normalmente distribuídos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7 - Resultados de teste de Anderson-Darling**

Curva	A	AA	p-valor
1	0,4519	0,4840	0,2284
2	0,1697	0,1807	0,9150
3	0,3206	0,3414	0,4945

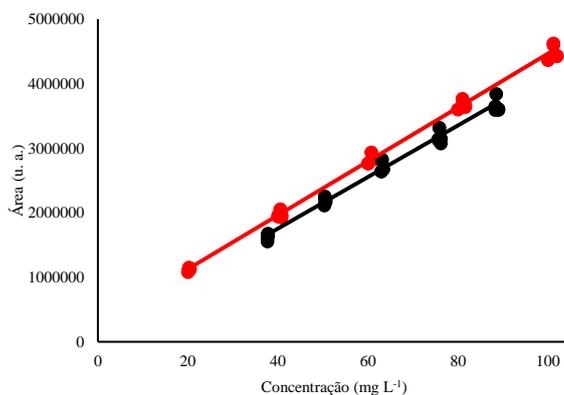
Portanto, os testes de Levene-Brown-Forsythe e de Anderson-Darling, asseguraram que os resíduos de regressão são homocedásticos e normalmente distribuídos. Contudo, o teste de Durbin-Watson evidenciou a existência de autocorrelação entre os resíduos. Assim, sugere-se a verificação da linearidade em uma faixa de concentração mais baixa. Uma outra hipótese poderia ser que o ajuste linear não seria o melhor para os dados disponíveis, mas essa não encontra respaldo na literatura, que tem o ajuste linear como consenso.[21, 23]

Não foi possível no contexto deste trabalho, verificar cada uma das hipóteses levantadas. Apesar da inadequação sugerida pelo teste de Durbin-Watson, os coeficientes de determinação maiores do que 0,98 e a confirmação da homocedasticidade e da normalidade pelos testes aplicados indicam a existência de correlação linear e de adequação ao modelo obtido por regressão. Procedeu-se, então, às próximas etapas do processo de validação para confirmar se o método seria adequado aos critérios adotados nos demais parâmetros.

## **4.2 Seletividade**

A Figura 11 apresenta a dispersão dos pontos nas curvas de calibração interna, confrontada com as curvas de calibração externa. As linhas de tendência são uma média das triplicatas de cada tipo, exibidas dessa forma para uma melhor visualização. Pela comparação dos coeficientes angulares, verificou-se que, em média, não há diferença significativa na inclinação das curvas de calibração interna e externa. A Tabela 8 apresenta os coeficientes angulares das curvas preparadas na ausência e na presença de amostra, e os respectivos p-valores obtidos nos testes F e t.

**Figura 11** - Dispersão dos pontos nas calibrações externa (em vermelho) e interna (em preto)



**Tabela 8** - Comparação entre as inclinações médias das curvas de calibração

Inclinações		p-valores	
Matriz ausente	Matriz presente	Teste F	Teste t
41102	40322		
42673	42828	0,109	0,432
41204	37814		

Em um nível de confiança de 95%,  $p\text{-valor} > 0,05$  no teste F significa que as variâncias podem ser consideradas estatisticamente iguais. No teste t com variâncias iguais,  $p\text{-valor} > 0,05$  indica que as médias dos dois conjuntos de dados podem ser consideradas iguais, com 95% de confiança.[33] Conclui-se, então, que não há efeito de matriz significativa, e o método pode ser executado com a curva de calibração preparada na ausência de matriz.

Apesar de esse ser o resultado esperado, a confirmação desse parâmetro não é trivial. As amostras comerciais não necessariamente contêm 100% de creatina, conforme alegado nos rótulos. Eventualmente, podem estar presentes nos produtos uma série de outras substâncias, sejam elas produtos de degradação, contaminantes, adulterantes ou aditivos, como corantes e flavorizantes, os quais poderiam, eventualmente, interferir nas medições.

Ressalva-se que nas três repetições foram utilizadas a mesma amostra. Seria interessante verificar a seletividade em outras amostras, com composições possivelmente variadas. Em um laboratório que rotineiramente analisa amostras de diversas procedências, essa verificação é interessante para assegurar a confiabilidade dos resultados. Além disso, mesmo que se trabalhe com amostras de uma mesma procedência,

verificar a seletividade com amostras de diferentes lotes poderia ser uma possível estratégia de reduzir o viés de confirmação das análises.

### 4.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados pelos parâmetros das curvas analíticas. Pelo teste de Grubbs, com 95% de confiança, nenhum dos três valores estimados foi considerado anômalo. Na Tabela 9 são apresentados o desvio padrão do menor nível de concentração e o coeficiente angular de cada curva, bem como os respectivos limites.

**Tabela 9** - Limites de detecção e de quantificação

b	S	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
41102	12365	0,9	3,0
42673	4170	0,3	1,0
41204	11075	0,8	2,7

Com base na Tabela 9, pode-se identificar limites de detecção e de quantificação médios de 0,67 e 2,22 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já seria esperado que os limites assim estimados fossem superestimados em relação àqueles obtidos pela relação sinal/ruído ou pela análise do branco. No entanto, não há diferença significativa em comparação com os valores relatados por outros autores, que chegam a 1,00 mg L<sup>-1</sup> para o LQ.[21] Não foi feita uma confirmação experimental dos limites estimados neste trabalho, porque o método estudado aplica-se à análise de amostras solubilizadas e diluídas a concentrações em torno de 50 mg L<sup>-1</sup>, que corresponde ao centro da faixa linear, muito acima dos limites estimados.

### 4.4 Tendência/recuperação e precisão

A Tabela 10 apresenta os resultados de recuperação em níveis de concentração baixa, média e alta. Para comparação, realizou-se o teste com as três curvas preparadas. Observa-se que nos três casos, a recuperação permanece dentro da faixa aceitável pela AOAC e adotada na recomendação do INMETRO, de 90 a 107 %.[5]

O resultado da análise da precisão, em condições de repetibilidade, é mostrado na Tabela 11. Em todos os níveis de concentração e com base nas três curvas preparadas, o desvio padrão relativo da recuperação permanece abaixo 5,3%, recomendado como limite

máximo aceitável para dispersão dos resultados pela AOAC e adotado pelo INMETRO.[5]

**Tabela 10** - Resultados dos testes de recuperação

Nível	Recuperação média (%)		
	Curva 1	Curva2	Curva 3
1	100±2	94±2	101±2
3	102±2	98±2	102±2
5	101±2	97±2	101±2

**Tabela 11** - Resultados dos testes de precisão

Nível	DPR (%)		
	Curva 1	Curva2	Curva 3
1	2,77	2,85	2,74
3	2,37	2,59	2,56
5	2,66	2,67	2,65

Com base nesses resultados, o método estudado poderia ser considerado adequado aos limites aceitáveis de exatidão e precisão. Ressalva-se que a precisão foi acessada apenas em condições de repetibilidade. Seria recomendável, em continuidade ao processo de validação intralaboratorial, realizar também a avaliação da precisão em condições de precisão intermediária, executando-se o método por analista diferente, para mensurar o efeito da alteração dessa condição na variabilidade dos resultados. Quanto à exatidão, esse resultado poderia ainda ser confirmado por ensaios de recuperação com amostras controle ou por comparação com material de referência certificado, a depender da disponibilidade de material e do rigor desejado.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho verificou os parâmetros linearidade, seletividade, limites de detecção e de quantificação, tendência/recuperação e precisão para validação de um método para a determinação do teor de creatina em suplementos por HPLC com detector de UV-Vis. Foram obtidos coeficientes de determinação superiores até a 0,999, os quais seriam considerados satisfatórios para assegurar a faixa linear de trabalho de 20 a 100 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, nem todas as premissas de regressão foram atendidas. Os resíduos foram considerados homocedásticos, pelo teste de Levene-Brown-Forsythe, e normalmente distribuídos, pelo teste de Anderson-Darling, mas não foram considerados independentes pelo teste de Durbin-Watson. Pode ser que a inconsistência captada no teste de Durbin-Watson seja resolvida adotando-se uma faixa de trabalho mais estreita, ou seja, que não chegue a 100 mg L<sup>-1</sup>.

No parâmetro seletividade, mostrou-se que não há efeito de matriz significativo. Estimou-se um limite de detecção médio de 0,67 mg L<sup>-1</sup> e um limite de quantificação médio de 2,22 mg L<sup>-1</sup>. Esses valores não foram confirmados experimentalmente, mas são coerentes com os limites reportados na literatura. A precisão, em condições de repetibilidade, foi considerada aceitável em toda a faixa de trabalho, testada com todas as curvas preparadas (DPR < 5%). A exatidão, medida como tendência, também foi considerada aceitável (90% < R < 100%).

Ademais, as etapas da validação executadas neste trabalho ainda podem ser complementadas com ensaios de recuperação que contemplem uma maior quantidade de repetições diárias, com a verificação da precisão intermediária e da reprodutibilidade e com testes de robustez. No âmbito do que foi possível executar, destaca-se como lição deste trabalho a complexidade envolvida em uma curva de calibração. Para um químico e analista em formação, fica marcada a importância da Estatística na formalização dos resultados e das etapas clássicas de preparo, tão decisivas para a qualidade de uma análise quanto a estabilidade das condições instrumentais.

## REFERÊNCIAS

1. Daskal Hirschbruch M, Fisberg M, Mochizuki L, Fisberg R, Borges Lagoa M (2008) Consumo de suplementos por jovens frequentadores de academias de ginástica em São Paulo. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 14:539–543
2. Peralta J, Maria O, Amancio S (2002) Creatine as an ergogenic supplement for athletes. *Revista de Nutrição* 15:83–93
3. Swartz M (2010) HPLC detectors: A brief review. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 33:1130–1150
4. Souza SVC, Junqueira RG (2005) A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta* 552:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>
5. Brasil, Instituto Nacional de Metrologia Q e T (2020) DOQ-CGCRE-008/2020, Orientação sobre validação de métodos analíticos.
6. Dash AK, Mo Y, Pyne A (2002) Solid-State Properties of Creatine Monohydrate. *J Pharm Sci* 91:708–718
7. Greenhaff PL (2000) Creatine. In: Maughan RJ (ed) *Nutrition in Sports*. Blackwell Science, pp 367–378
8. Andres S, Ziegenhagen R, Trefflich I, Pevny S, Schultrich K, Braun H, Schänzer W, Hirsch-Ernst KI, Schäfer B, Lampen A (2017) Creatine and creatine forms intended for sports nutrition. *Mol Nutr Food Res* 61
9. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2018) Instrução Normativa IN 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. *Diário Oficial da União*
10. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2018) Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. *Diário Oficial da União*
11. Moret S, Prevarin A, Tubaro F (2011) Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. *Food Chem* 126:1232–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.028>

12. Pischel I, Gastner T (2007) Creatine - Its chemical synthesis, chemistry, and legal status. In: Salomons GS, Wyss M (eds) *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*. Springer, pp 291–307
13. Marymont JH, Smith JN, Klotsch S (1968) A simple method for urine creatine. *The American Journal of Clinical Pathology* 49:289–292
14. Lau HKY, Guilbault GG (1974) A fluorometric kinetic method for creatine in urine. *Clinica Chimica Acta* 53:209–216
15. Elbir Z, Oz F (2021) Determination of creatine, creatinine, free amino acid and heterocyclic aromatic amine contents of plain beef and chicken juices. *J Food Sci Technol* 58:3293–3302. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04875-8>
16. Fernández-Fernández M, Rodríguez-González P, Añón Álvarez ME, Rodríguez F, Álvarez Menéndez F V., García Alonso JI (2015) Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Anal Chem* 87:3755–3763. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00769>
17. Ueda S, Sakasegawa SI (2016) Enzymatic cycling method using creatine kinase to measure creatine by real-time detection. *Anal Biochem* 506:8–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.019>
18. Boenzi S, Rizzo C, Di Ciommo VM, Martinelli D, Goffredo BM, La Marca G, Dionisi-Vici C (2011) Simultaneous determination of creatine and guanidinoacetate in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Pharm Biomed Anal* 56:792–798. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.06.006>
19. Lambert GF (1945) The determination of creatine and creatinine. *Journal of Biological Chemistry* 161:679–683. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41500-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41500-6)
20. Jabs CM, Nelen P, Thomas EJ (1988) Plasma Creatine Determination Using a Luminescence Method. *MEDICINE AND METABOLIC BIOLOGY* 39:267–272
21. Dash AK, Sawhney A (2002) A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulations. *J Pharm Biomed Anal* 29:939–945
22. Yue-dong Y (1998) Simultaneous determination of creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography. *Biomedical*

- Chromatography 12:47–49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199803/04\)12:2<47::AID-BMC717>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(199803/04)12:2<47::AID-BMC717>3.0.CO;2-Y)
23. Feizi A, Hamidi S, Bakalam N, Nemati M (2022) Control of the quality of creatine sports supplements using a validated LC method with UV detection. *Talanta Open* 6:. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100157>
  24. Jovanov P, Vraneš M, Sakač M, Gadžurić S, Panić J, Marić A, Ostojić S (2018) Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry as a method for simultaneous determination of guanidinoacetate and creatine. *Anal Chim Acta* 1028:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.038>
  25. Mo Y, Dobberpuhl D, Dash AK (2003) A simple HPLC method with pulsed EC detection for the analysis of creatine. *J Pharm Biomed Anal* 32:125–132. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00028-1)
  26. Persky AM, Hochhaus G, Brazeau GA (2003) Validation of a simple liquid chromatography assay for creatine suitable for pharmacokinetic applications, determination of plasma protein binding and verification of percent labeled claim of various creatine products. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794:157–165. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00452-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00452-5)
  27. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2011) Manual de garantia de qualidade analítica., 1st ed. Brasília
  28. Bussab W de O, Morettin PA (2010) Estatística básica, 6th ed. Saraiva, São Paulo
  29. Souza SVC de (2007) Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais
  30. Mohd Razali N, Bee Wah Y (2011) Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2:13–14
  31. Jäntschi L, Bolboacă SD (2018) Computation of probability associated with Anderson-Darling statistic. *Mathematics* 6:. <https://doi.org/10.3390/math6060088>
  32. Romeu JL (2003) Anderson-Darling: A Goodness of Fit Test for Small Samples Assumptions. *Selected Topics in Assurance Related Technologies* 10:
  33. Hibbert DB, Gooding JJ (2006) *Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists*. Oxford University Press, New York