

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Natani Oliveira Possa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE
COLECALCIFEROL POR CROMATOGRAFIA EM FASE NORMAL E
AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE**

Belo Horizonte (MG)

2020

Natani Oliveira Possa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE
COLECALCIFEROL POR CROMATOGRAFIA EM FASE NORMAL E
AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE**

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

**Orientador: Prof. Dr. Patterson Patrício de
Souza.**

Co-orientador: Leonardo Henrique Siqueira.

Belo Horizonte (MG)

2020

Natani Oliveira Possa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE
COLECALCIFEROL POR CROMATOGRAFIA EM FASE NORMAL E
AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE**

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

Belo Horizonte, 02 de novembro de 2020

**Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza
(Orientador – CEFET-MG)**

**Leonardo Henrique Siqueira
(Co-orientador – PharmaScience Indústria Farmacêutica)**

Elisângela, minha mãe, meu exemplo de força, sabedoria e persistência.

Deus, por todos os feitos.

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a Deus por me guiar até aqui. Ao Patterson Patrício e Leonardo Henrique, que aceitaram a minha proposta, me instruíram e me apoiaram durante toda a jornada deste trabalho. Ao Márcio Basílio, meu pai acadêmico, professor, amigo e minha referência. As professoras Patrícia Rezende e Janice Cardoso, minhas maiores inspirações. A minha família, que mesmo nos momentos mais difíceis esteve ao meu lado e a minha mãe em especial, que sempre fez de tudo e mais um pouco para que eu pudesse estudar e realizar meu sonho de formar como Química Tecnológica.

Aos meus colegas de graduação, e em especial, ao Gabriel Machado, por ter sido um grande companheiro de estudos, por todas as conversas sobre o mundo microscópico e macroscópico, as madrugadas de estudos, as borrachas gastas, pelas aulas no Skype, pelas reações desenhadas no espelho, pelos almoços pós aulas e as fórmulas escritas em folhas de guardanapo, por cada café e as discussões infundáveis de física e química. A Mayara Suzuki, que esteve ao meu lado em um momento decisivo da graduação, que segurou minha mão e não soltou mais.

Ao CEFET-MG por ser uma instituição inclusiva, acolhedora, gratuita e de qualidade. Aos meus colegas da PharmaSciencie Indústria Farmacêutica, por todo conhecimento compartilhado, a minha supervisora de estágio Kelen Torre Siqueira, pela oportunidade que a mim foi dada e por ter apoiado esse projeto do início ao fim. A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação profissional e pessoal, que passaram por mim e me tornaram uma pessoa melhor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FM – Fase Móvel

FN – Fase Normal

FE – Fase Estacionária

H0 – Hipótese Nula

HPLC – “*High performance liquid chromatography*”

MMQ - Método dos Mínimos Quadrados

R - Coeficiente de Correlação de Pearson

R²- Coeficiente de Determinação

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

SQR – Substância Química de Referência

TCL – Teorema Central do Limite

RESUMO

O desenvolvimento de novos métodos é de suma importância como alternativa para métodos analíticos compendiais. Após o desenvolvimento, é imprescindível que a metodologia analítica seja validada de acordo com as especificações estabelecidas pela ANVISA. Dessa forma, o método de doseamento do colecalciferol por cromatografia em fase normal torna-se uma necessidade, pois contempla os requisitos necessários para atender a RDC N° 166, de 24 de junho de 2017 e a RDC N° 53, de 4 de dezembro de 2015. O presente trabalho teve como objetivo a proposta de um método analítico instrumental por cromatografia em fase normal e o estudo da linearidade deste método, para posterior validação completa e uso da metodologia em produtos de uma indústria farmacêutica, localizada em Betim – Minas Gerais. O trabalho foi realizado de maneira empírica, com abordagem quantitativa, de caráter descritivo empregando-se procedimentos de revisão bibliográfica e parte experimental. Inicialmente foram estudadas as metodologias farmacopéicas que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a partir disso, propôs-se um método visando garantir a quantificação das possíveis impurezas farmacêuticas. Após diferentes condições cromatográficas aplicadas ao método verificou-se que a metodologia mais eficaz para o colecalciferol se deu por cromatografia em fase normal empregando hexano, 1-pentanol e acetonitrila como fase móvel, e como fase estacionária uma coluna de sílica. Realizado o desenvolvimento do método, seguiu-se para a avaliação da linearidade, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 166, de 24 de junho de 2017.

Palavras chave: Colecalciferol; Cromatografia em fase normal; Validação de método.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do colecalciferol.	2
Figura 2: Biossíntese da vitamina D ₃	3
Figura 3: Conversão na forma ativa da vitamina D ₃	3
Figura 4: Esquema de um cromatógrafo líquido.	5
Figura 5: Mecanismo de separação em fase normal.	6
Figura 6: Efeito da água como agente desativador da superfície da sílica. Ea = Atividade da superfície (α na notação do modelo de Snyder).	7
Figura 7: Diagrama de blocos utilizado na avaliação e adequação de método oficial ou padrão.	9
Figura 8: Preparo dos níveis da curva de calibração.	11
Figura 9: Fluxograma de avaliação da linearidade.	17
Figura 10: Estrutura para coluna de aminopropilsilano (NH ₂).	19
Figura 11: – Estrutura para coluna de Sílica.	19
Figura 12: Triângulo de seletividade para os solventes preferidos em: — fase reversa, ----- fase normal. MeOH: metanol; ACN: acetonitrila; THF: tetrahydrofurano, MTBE: éter metil terc-butílico; CHCl ₃ : clorofórmio; CH ₂ Cl ₂ : cloreto de metileno.	21
Figura 13: Cromatograma referente ao padrão de colecalciferol empregando-se a fase contendo 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila e coluna de sílica.	22
Figura 14: Cromatograma referente a matéria prima de colecalciferol empregando-se a fase contendo 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila e coluna de sílica.	23
Figura 15: Estrutura molecular do dl- α -tocoferol (vitamina E).	23
Figura 16: Estrutura molecular do pré colecalciferol (pré vitamina D ₃).	23
Figura 17: Estrutura molecular do pré colecalciferol (pré vitamina D ₃).	24
Figura 18: Cromatograma referente ao padrão de colecalciferol empregando-se a fase contendo 60% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,01% de tetrahydrofurano e coluna amino.	25
Figura 19: Cromatograma referente a matéria prima de colecalciferol empregando-se a fase contendo 60% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,01% de tetrahydrofurano e coluna amino.	25
Figura 20: Estatísticas descritivas para inspeção visual dos dados.	28
Figura 21: Gráfico da curva de calibração.	30

Figura 22: Relação entre área e concentração.	30
Figura 23: Coeficiente de correlação de Pearson (R).	31
Figura 24: Coeficiente de determinação (R^2).	31
Figura 25: Análise de variância gerada pelo Minitab®.	34
Figura 26: Gráfico de <i>outlier</i> dos resíduos versus a concentração.	36
Figura 27: Gráfico de probabilidade normal.	38
Figura 28: Histograma para distribuição normal.	39
Figura 29: Teste de Bartlett para igualdade de variâncias.	41
Figura 30: Gráfico de ordem de observação <i>versus</i> resíduos.	42
Figura 31: Gráfico de valores ajustados <i>versus</i> resíduos e valor de D.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo da curva de calibração.....	16
Tabela 2: Sequência aleatória do preparo da curva de calibração processada pelo software MINITAB®.....	16
Tabela 3: Sequência aleatória da curva A da linearidade processada pelo software Minitab®.....	17
Tabela 4: Sequência aleatória da curva B da linearidade processada pelo software Minitab®.....	18
Tabela 5: Sequência aleatória da curva C da linearidade processada pelo software Minitab®.....	18
Tabela 6: Valores de pH e log P para a molécula de colecalciferol.....	21
Tabela 7: Valores de polaridade para solventes utilizados em HPLC FN.....	22
Tabela 8: Dados da curva de calibração da Linearidade.....	27
Tabela 9: Valores de C calculado e C crítico.....	32
Tabela 10: Valores de F tabelado e F calculado.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Parâmetros a serem considerados na validação analítica.	10
Quadro 2: Critério de decisão para o método de estimação da curva.....	29
Quadro 3: Critério de decisão para o Teste de Cochran.	33
Quadro 4: Avaliação da inclinação da curva.	34
Quadro 5: Avaliação do intercepto da curva.	35
Quadro 6: Critério de decisão para teste de outlier.	36
Quadro 7: Critério de decisão para teste de normalidade.	37
Quadro 8: Critérios de decisão para avaliação do teste de Bartlett.	40
Quadro 9: Avaliação das hipóteses para teste de Durbin-Watson.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Colecalciferol (Vitamina D ₃).....	2
2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	4
2.2.1. Cromatografia em Fase normal	5
2.3. Desenvolvimento Analítico	8
2.4. Validação - RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017 (ANVISA).....	9
2.4.1. Linearidade	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Materiais e Reagentes.....	12
3.1.1. <i>Padrão Sigma</i>	12
3.1.2. <i>Padrão Primário – Linearidade</i>	12
3.1.3. <i>Matéria-prima</i>	12
3.1.5. <i>Solventes e Reagentes</i>	12
3.1.6. <i>Equipamentos</i>	13
3.1.7. <i>Instrumentação - HPLC</i>	13
3.1.8. <i>Fase móvel e coluna comparativas</i>	13
3.2. Método proposto – (HPLC).....	14
3.2.1. <i>Preparo do Padrão</i>	14
3.2.2. <i>Preparo da matéria-prima</i>	14
3.2.3. <i>Condições Cromatográficas</i>	15
3.2.3.1. <i>Preparo da Fase Móvel A</i>	15
3.2.3.2. <i>Preparo da Fase Móvel B</i>	15
3.3. Avaliação da Linearidade do Método.....	15
3.3.1. <i>Linearidade</i>	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Desenvolvimento do Método.....	19
4.1.1. <i>Seleção da fase estacionária</i>	19
4.1.2. <i>Seleção da fase móvel</i>	20
4.2. Avaliação da Linearidade do Método.....	26
4.2.1. <i>Seleção dos pontos</i>	26
4.2.2. <i>Dados gerados da curva de calibração</i>	26
4.2.3. <i>Método dos mínimos quadrados (MMQ)</i>	28
4.2.4. <i>Inspeção Visual da Curva</i>	29
4.2.4.1 <i>Avaliação dos Coeficientes de Correlação (R) e Determinação (R²)</i>	30
4.2.5. <i>Teste de Cochran</i>	32

4.2.6. ANOVA	33
4.2.7. Avaliação dos Resíduos	35
4.2.7.1. Teste de Outlier.....	35
4.2.7.2. Teste de Anderson-Darling.....	37
4.2.7.3. Teste de Igualdade de Variâncias.....	39
4.2.7.4. Teste de Durbin-Watson	41
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Em decorrência do valor imprescindível ao equilíbrio funcional do organismo humano, por conseguinte, à manutenção da saúde, medicamentos à base de associações entre vitaminas, como a vitamina D₃, têm sido produzidos na indústria farmacêutica. Dessa forma, para se desenvolver um novo produto farmacêutico que contenha o colecalciferol com propósito nutracêutico ou medicamentoso, é necessário realizar o doseamento para mensurar o teor de princípio ativo no medicamento, determinando a concentração dos analitos essenciais na amostra e verificação dos parâmetros de qualidade do insumo (ICH, 2009).

A metodologia de dosagem de vitamina D₃ em medicamentos farmacêuticos necessita contemplar os requisitos necessários para atender a RDC N° 166, de 24 de junho de 2017 e a RDC N° 53, de 4 de dezembro de 2015. Entretanto, o método por cromatografia em fase reversa não atende em termos de identificação de possíveis impurezas farmacêuticas. Sendo assim, existe a necessidade da utilização da técnica instrumental de cromatografia em fase normal (ANVISA, 2017).

Os métodos farmacopeicos para a quantificação da vitamina D₃ utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com variação de colunas, fases móveis e solventes (USP, 2007). Para realizar a dosagem do colecalciferol em diferentes lotes de matérias-primas de colecalciferol (vitamina D₃), e posterior aplicação da metodologia em produtos, desenvolveu-se um método analítico de dosagem por meio da cromatografia em fase normal e, em seguida, realizou-se a verificação de linearidade, parâmetro necessário para validação analítica de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 166, de 24 de julho de 2017.

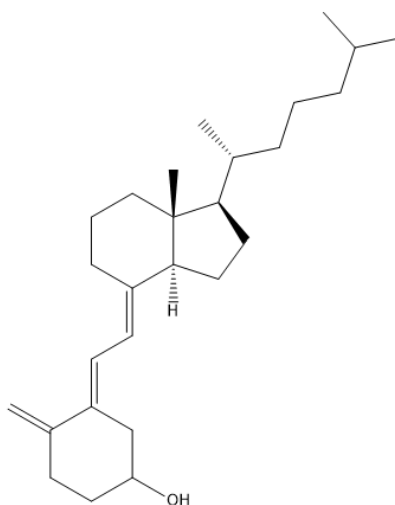
Objetivando avaliar a linearidade do método analítico realizou-se o teste de hipóteses para a estimação da curva de calibração pelo método dos mínimos quadrados, a avaliação dos coeficientes de correlação e determinação, o teste de Cochran, ANOVA, teste de *outlier* pelo teste de Grubbs e a análise de correlação dos resíduos pelo teste de Durbin Watson, através do *software* estatístico Minitab®.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Colecalciferol (Vitamina D₃)

O colecalciferol é uma vitamina lipossolúvel da família dos secosteróis e sua molécula é caracterizada por uma clivagem na ligação 9,10 do anel B do núcleo esteróide (EITENMILLER, 2008). Possui fórmula estrutural C₂₇H₄₄O, com peso molecular de 384,6 g.mol⁻¹ e ponto de fusão de 84,5 °C (DRUGBANK, 2012). O colecalciferol apresenta estrutura molecular de acordo com a Figura 1.

Figura 1: Estrutura molecular do colecalciferol.



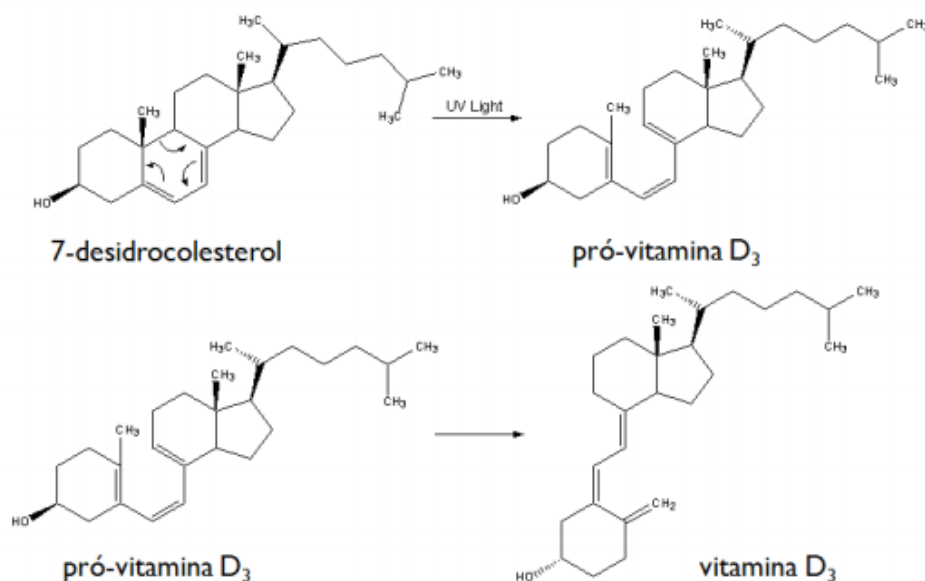
A vitamina D₃ tem como função primária no organismo regular os níveis de fósforo e cálcio. Dessa forma, a absorção intestinal ocorre pela síntese de calbindina, uma proteína ligante de cálcio que é responsável pelo seu transporte pelos canais de cálcio, também estimulados na presença de vitamina D₃. Além disso, estimula-se a atividade da fosfatase alcalina, responsável por hidrolisar fosfatos orgânicos. Este processo garante a absorção adequada dos íons fósforo e cálcio, que são indispensáveis para o metabolismo osteomuscular (HOLICK et al., 2011).

De acordo com HOLICK, (2007) populações de maior risco de deficiência de vitamina D₃, como as de regiões de maior latitude, de baixa ingestão dietética diária e com menor exposição solar, estão mais propensas desenvolver diversos tipos de cânceres, doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, distúrbios psiquiátricos, distúrbios intestinais e problemas respiratórios.

O colecalciferol é sintetizado na pele a partir do 7-desidrocolesterol, através de duas reações pericíclicas. Segundo NELSON, D. L., COX, M. M. (2006), a primeira é uma reação eletrocíclica que promove a abertura do segundo anel de seis membros, e

ocorre em condições fotoquímicas, sendo catalisada pela luz UV do sol. A pró-vitamina D₃ sofre então um rearranjo sigmatrópico para formar a vitamina D₃, Figura 2.

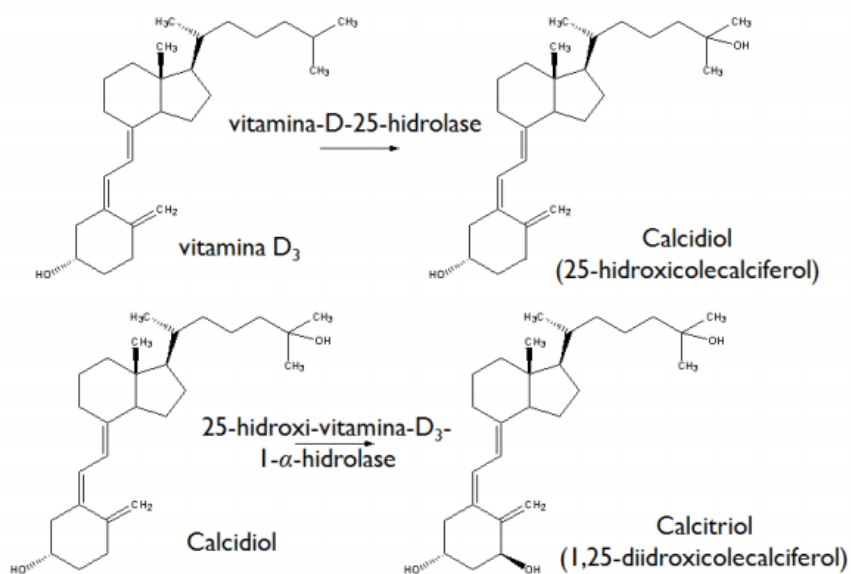
Figura 2: Biossíntese da vitamina D₃.



Fonte: Adaptado de NELSON, D. L., COX, M. M. (2006)

Ao serem formadas na pele, a vitamina D₃ ainda está inativa, por isso, existe a necessidade de ser ativada no fígado e no rim mediante hidroxilações sucessivas, na qual ocorre a adição de dois grupos hidroxila, que ocorrem a primeira no fígado e a segunda nos rins, o que resulta na forma hormonal ativa predominante, ou seja, o 1,25-hidróxicolecalciferol ou calcitriol. (BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007). A Figura 3 apresenta as reações para a conversação na forma ativa da vitamina D₃.

Figura 3: Conversão na forma ativa da vitamina D₃.



Fonte: Adaptado de NELSON, D. L., COX, M. M. (2006)

O conhecimento da rota de síntese da molécula e das propriedades físico-químicas e a são fundamentais no desenvolvimento do método analítico. As variações na forma sólida de uma matéria prima farmacêutica podem provocar alterações significativas em propriedades físico-químicas, incluindo características organolépticas, morfologia, estabilidade e taxa de dissolução (BUGAY, 2001). Desta forma, a certificação dos padrões farmacopeicos evitam falhas no desenvolvimento, reanálises, desvios de qualidade do produto final, e até perda do lote de produção (SOARES-SOBRINHO, 2010).

As dosagens utilizadas em medicamentos de vitamina D₃ variam de 5.000 a 100.000 UI, ao se desenvolver um novo produto farmacêutico que contém uma dose de colecalciferol de propósito nutracêutico ou medicamentoso, sua caracterização deve ser efetuada criteriosamente para obtenção e verificação dos parâmetros de qualidade do insumo (ICH, 2009).

A vitamina D possui instabilidade química devido estresse térmico, com isso, ocorre a degradação do composto e formação de produtos de degradação. Este princípio ativo apresenta-se muito sensível a radiação ultravioleta, oxigênio e umidade (PETRITZ; TRITTHART; WINTERSTEIGER, 2006). A verificação de tais produtos de degradação são possíveis através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação que possui alta relevância quando comparada a outras técnicas dessa mesma família, uma vez que possibilita a separação de misturas que contêm muitos compostos similares. Essa técnica, cujo nome empregado em português dá-se como “CLAE” utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados, emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Com isso, tem-se a possibilidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

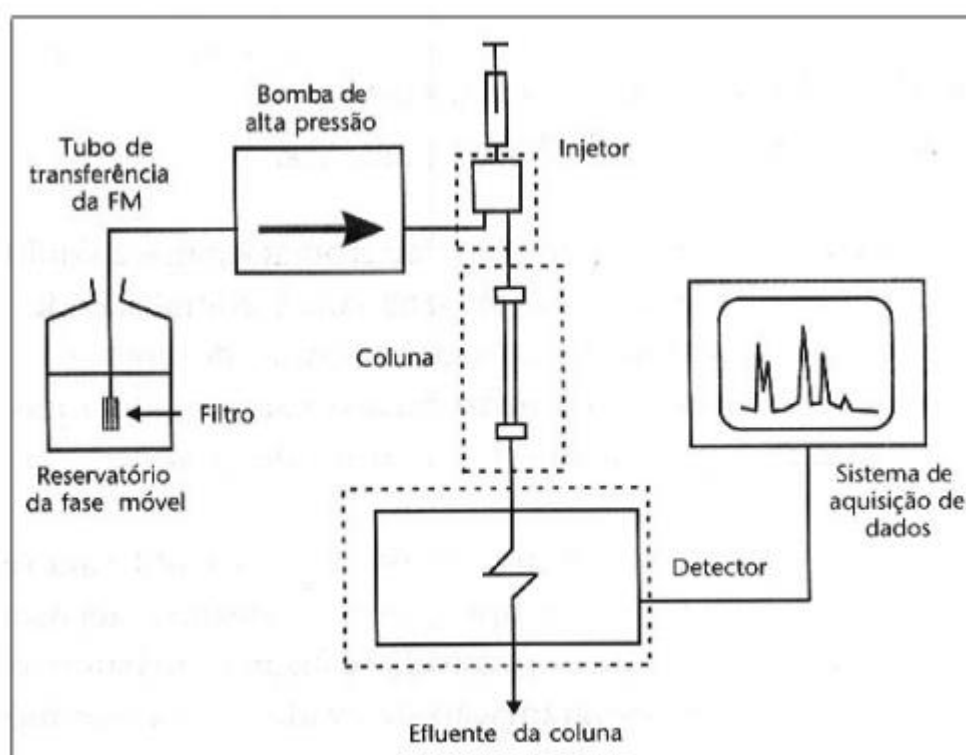
Houve um avanço considerável da cromatografia líquida moderna a partir da década de 1970, que até então era subdesenvolvida e baseava-se nos experimentos sobre cromatografia em coluna, que hoje é conhecida como cromatografia líquida clássica. A partir de então, ocorreu o desenvolvimento de detectores espectrofotométricos que

operam em comprimento de onda variado. Com isso, tornou-se possível a detecção de uma faixa ampla de compostos e a análise de compostos em baixas concentrações presentes em amostras complexas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Na CLAE, a fase móvel é acondicionada a um frasco apropriado, de forma que seja aspirada com o auxílio de uma bomba de alta pressão, em direção a coluna. No caminho, a amostra é introduzida na fase móvel por uma válvula de injeção da amostra e arrastada para a coluna, onde ocorre a separação. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluidos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado por um *software* apropriado, tratado no computador, e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (LANÇAS, 2016).

Os equipamentos são usualmente modulares, como apresentado na Figura 4.

Figura 4: Esquema de um cromatógrafo líquido.



Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, (2006).

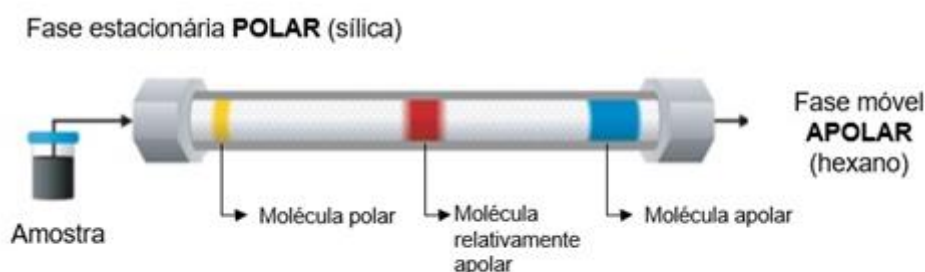
2.2.1. Cromatografia em Fase normal

Na cromatografia em fase normal emprega-se usualmente fases estacionárias bastante polares, geralmente colunas de sílica, alumina e outros. Sendo assim, a fase

móvel a ser empregada é menos polar, como por exemplo hexano, iso-octano ou pentano, modificado por solventes de baixa polaridade e o mecanismo principal operante neste modo é a adsorção. Com o desenvolvimento das fases quimicamente ligadas, tornou-se possível substituir o grupo silanol (Si-OH) da superfície da sílica por grupos polares do tipo amino (NH₂). A fase quimicamente ligada é preparada de forma que se substitua o grupo silanol por um grupo polar (NH₂, CN, diol e outros) (LANÇAS, 2016).

Assim, a coluna operará em fase normal, pelo fato de a polaridade da fase móvel e estacionária serem similares à polaridade destas, como mostrado na Figura 5.

Figura 5: Mecanismo de separação em fase normal.



Fonte: Adaptado de “HPLC separation modes: Waters”.

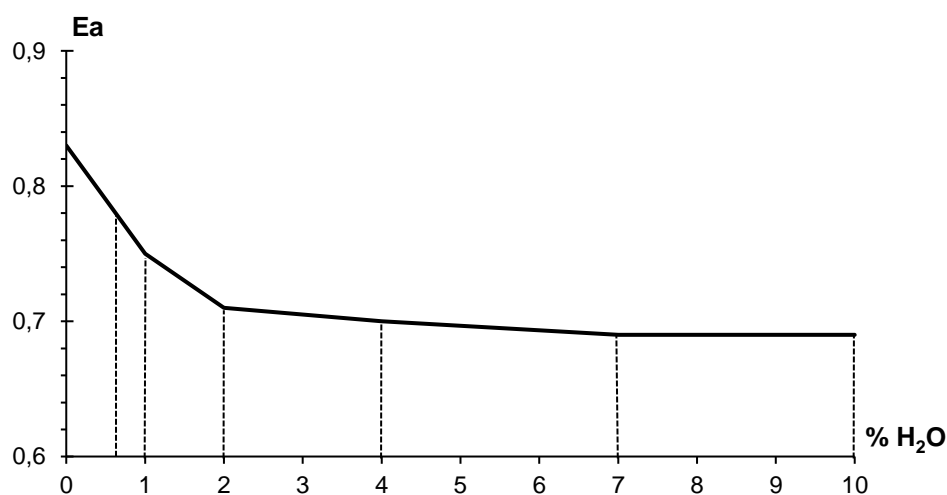
O mecanismo de separação na cromatografia em fase normal baseia-se na competição entre moléculas da amostra e as da fase móvel, para ocupar os sítios ativos da coluna. Como o adsorvente possui superfície polar, as moléculas apolares possuem baixa afinidade com a superfície, portanto, saem primeiro na ordem de eluição. Já as moléculas mais polares, possuem maior interação com a fase estacionária, ou seja, passam mais tempo retidas, portanto, saem por último na ordem de eluição do cromatograma obtido (LANÇAS, 2016).

As interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio possibilitam a retenção dos grupos funcionais polares do analito na fase estacionária, resultado das interações eletrostática entre os átomos de hidrogênio com os de oxigênio das moléculas envolvidas, principalmente. No caso das moléculas polarizáveis, a interação do tipo dipolo induzido-dipolo prevalece como mecanismo de interação com a superfície do adsorvente, dessa forma, possibilitam a retenção dos grupos funcionais polares do

analito na fase estacionária. Portanto, os compostos mais polares são eluídos depois dos compostos menos polares (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A retenção e a seletividade em cromatografia de adsorção líquido-sólido são bastantes influenciadas pela presença de modificadores polares na fase móvel, mesmo que em baixas concentrações. A presença de água em fases móveis apolares pode desativar a superfície da sílica, de forma que à medida que a quantidade de água aumenta, a atividade da sílica diminui. Dessa forma, a quantidade de água na superfície da sílica e na fase móvel deve ser cuidadosamente controlada nessa forma de cromatografia (LANÇAS, 2016). O efeito da água como agente desativador da superfície da sílica é apresentado pelo gráfico a seguir, Figura 6.

Figura 6: Efeito da água como agente desativador da superfície da sílica. E_a = Atividade da superfície (α na notação do modelo de Snyder).



Fonte: Adaptado de (LANÇAS, 2016)

A superfície da sílica empregada em HPLC é submetida a determinados processos de desativação com a finalidade de diminuir a retenção de moléculas muito polares e, dessa forma, manter a coluna em condições uniformes, o que conseqüentemente contribui para a repetitividade das análises (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O uso controlado de moderadores é benéfico uma vez que resultam em menor variação no tempo de retenção de uma corrida para outra e um aumento substancial na capacidade da coluna, em razão de um aumento na linearidade das isotermas de adsorção. Observa-se, também, uma redução na cauda dos picos, diminuição na decomposição da amostra e aumento na eficiência da coluna. Isso se deve a adsorção

preferencial do moderador da fase móvel pelos sítios ativos na superfície do adsorvente, conduzindo a uma nova superfície desse adsorvente, mais homogênea e eficiente (LANÇAS, 2016).

2.3. Desenvolvimento Analítico

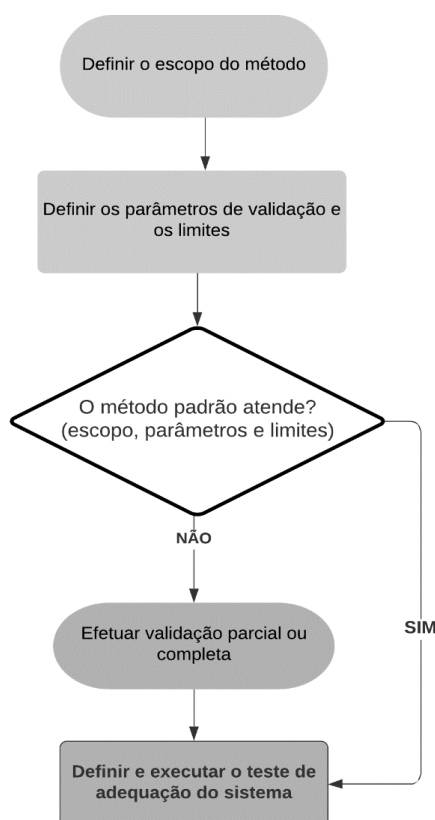
A qualidade de um método analítico é determinada pela qualidade de suas etapas, com seus erros experimentais. Essa qualidade depende desde a etapa de amostragem a qual seleciona-se a amostra de forma representativa, até a quantificação dos analitos (GONÇALVES, 2005).

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas vem sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos sociais e financeiros irreversíveis (RIBANIL et al., 2004).

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra testada, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (LIMA et al., 2006).

Nesse contexto, a validação metodológica consiste no desenvolvimento, e posterior controle, de determinada metodologia analítica implantada em um laboratório, parte fundamental da garantia de qualidade. O procedimento para validação de uma metodologia analítica pode variar dependendo do objetivo da análise (LANÇAS, 2016). A Figura 7 apresenta um fluxograma de etapas para avaliação e adequação de método oficial ou padrão.

Figura 7: Fluxograma para avaliação e adequação de método oficial ou padrão.



Fonte: Adaptado de (LANÇAS, 2016)

2.4. Validação - RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 (ANVISA)

A validação analítica é descrita pela avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais, de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (ANVISA, 2017).

A utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela Anvisa requer a realização de uma validação analítica, conforme parâmetros estabelecidos na resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. A validação deve demonstrar que os resultados produzidos são confiáveis, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Os critérios são definidos de acordo com o tipo de validação a ser realizado (ANVISA, 2017b).

Os parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação devem ser definidos de acordo com as características do analito e da natureza do método. A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos (ANVISA, 2017).

Os parâmetros típicos a serem considerados para a validação dependem do ensaio a ser realizado e estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Doseamento
Linearidade	Sim
Precisão	Sim
Repetibilidade	
Precisão Intermediária	Sim
Seletividade	Sim
Limite de Detecção	Não
Limite de Quantificação	Não
Exatidão	Sim
Intervalo	Sim

Fonte: Adaptado de (ANVISA, 2016)

Os critérios de aceitação devem cumprir os parâmetros exigidos pelo método como adequabilidade do sistema, sendo esses específicos para cada método (ANVISA, 2017).

Tipicamente avalia-se os parâmetros de pratos teóricos, assimetria, resolução, fator de retenção e desvio padrão entre as réplicas. Todos os métodos analíticos devem ter seus parâmetros de adequabilidade definidos no procedimento (ANVISA, 2017).

2.4.1. Linearidade

A linearidade do método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (ANVISA, 2017).

Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SRQ) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. As soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR (ANVISA, 2017).

De acordo com (ANVISA, 2017), para avaliação da linearidade, devem ser apresentados a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística,

equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados, avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e avaliação da significância do coeficiente angular.

Art. 26 Todos os cálculos para a avaliação da linearidade devem ser realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais. Art. 27 Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados: I.- representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; II.- gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; III.- equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados; IV.- avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2); V.- avaliação da significância do coeficiente angular. § 1º A homocedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado. § 2º Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento). § 3º O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. § 4º O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (ANVISA, 2017, p. 9 e 10).

Realiza-se o preparo e leitura das soluções padrões de maneira independente e aleatória para que seja possível avaliação estatística correta, troca-se pipetas e ponteiros no momento de preparo de cada solução. Prepara-se cada nível de concentração de maneira independente, isto é, a partir de diferentes pesagens da Substância Química de Referência (SQR) (BARWICK, 2003).

As soluções devem ser preparadas seguindo-se a forma apresentada na Figura 8.

Figura 8: Preparo dos níveis da curva de calibração.



Fonte: BARWICK, 2003.

As injeções no sistema cromatográfico também devem ser realizadas de maneira aleatória. Essa ordem aleatória, para o preparo e para a injeção devem ser geradas pelo software Minitab[®] (MAPA, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e Reagentes

3.1.1. Padrão Sigma

Para o desenvolvimento do método, o colecalciferol utilizado foi o Padrão Sigma - ALDRICH, lote LRAB2929, CAS 67970. Segundo especificação do laudo de análise, o colecalciferol foi conservado ao abrigo da luz, umidade e em temperatura entre 15 e 30 °C.

3.1.2. Padrão Primário – Linearidade

Para o preparo da curva de linearidade, o colecalciferol utilizado foi o Padrão Primário - USP REFERENCE STANDARD, lote R07150, CAT No. 11331009, validade dezembro de 2021. Segundo especificação do laudo de análise, o colecalciferol foi conservado ao abrigo da luz, umidade e em temperatura entre 15 e 30 °C.

3.1.3. Matéria-prima

Foi utilizado a matéria-prima Vitamina D₃ 100 SD/S (Código V10266.001) fabricada pela DSM, LOTE: UT181110048, com validade para 05/11/2020. O colecalciferol (Vitamina D₃) 100.000 U.I., consiste em uma mistura de 100.000 U.I. de vitamina D₃ (colecalciferol) por grama. 1 g de Vitamina D₃ 100.000 U.I. contém 2,50 a 2,75 mg de colecalciferol, correspondente à faixa de 100.000 UI a 110.000 U.I.

A matéria-prima fracionada foi conservada ao abrigo de luz, fontes de calor e condicionada a uma temperatura inferior a 15 °C, segundo as especificações da fabricante.

3.1.5. Solventes e Reagentes

Para a fase móvel aplicada ao método utilizou-se como solvente uma proporção de 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila. Sendo o n-hexano grau HPLC (C₆H₁₄) (Honeywell, Lote 34859-4x4L), 1-pentanol grau HPLC (C₅H₁₂) (Sigma Aldrich, Lote STBG-0493), acetonitrila grau HPLC (C₂H₃N) (Honeywell – Lote DX418-BR).

Para a etapa de extração do colecalciferol nas amostras utilizou-se como reagentes o n-hexano grau HPLC (C_6H_{14}) (Honeywell, Lote 34859-4x4L) e (Dimetilsufóxido P.A. ($(CH_3)_2SO$) (ACS, Lote 32278).

Para a diluição do padrão utilizou-se o n-hexano grau HPLC (C_6H_{14}) (Honeywell, Lote 34859-4x4L).

Os reagentes utilizados não foram submetidos a qualquer tratamento prévio.

3.1.6. Equipamentos

Para medir a massa da matéria-prima e do padrão secundário de colecalciferol utilizados no desenvolvimento do método empregou-se a balança analítica OHAUS TAG BLCQ-0013 (Modelo FA214P; 220 V).

Para medir a massa do padrão primário de colecalciferol utilizado na validação analítica empregou-se a balança Mettler Toledo (Modelo XPR2; 110 V).

As etapas de extração de colecalciferol foram realizadas em Banho Ultrassônico (Modelo UNIQUE; 220 V), Vortex Denmark (Modelo CAPP CRV – 45X; 110 V) e centrífuga CENTRIBIO (Modelo TAG CERCQ – 0538).

3.1.7. Instrumentação - HPLC

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu, modular, equipado com os seguintes módulos: uma bomba LC-20AT, forno de coluna CTO-20ASVP, auto injetor SIL, detector SPD-M20A Prominence, número de série L201556, e *software* Lab-Solutions versão 5.98. O sistema analítico incluiu uma coluna Spheri-5 Sílica com tamanho de partícula de 5 μm , tamanho de poros 70 Angstroms, comprimento 250 mm e diâmetro interno 4,6 mm.

3.1.8. Fase móvel e coluna comparativas

Para a fase móvel comparativa a fase do método utilizou-se como solvente uma proporção de 59,9% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,1% de tetrahydrofurano. Sendo o n-hexano grau HPLC (C_6H_{14}) (Honeywell, Lote 34859-4x4L), Clorofórmio ($CHCl_3$) (J.T. Baker, Lote T39C52), tetrahydrofurano (C_4H_8O) (Lichrosolv, Lote 11091701).

Para fase estacionária comparativa a do método utilizou-se a coluna ZORBAX NH_2 com tamanho de partícula de 5 μm , tamanho de poros 70 Angstrom, comprimento 250 mm e diâmetro interno 4,6 mm.

3.2. Método proposto – (HPLC)

3.2.1. Preparo do Padrão

Mediu-se 10,00 mg do padrão de colecalciferol, utilizando-se papel vegetal, em uma balança analítica. Verteu-se o padrão em um balão volumétrico de 100,00 mL com o auxílio de algumas gotas de N-Hexano grau HPLC, limpando todo o papel. Em seguida, completou-se o volume do balão com o diluente, aferiu-se o menisco e homogeneizou-se a solução.

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, pipetou-se 20,00 mL da solução para balão volumétrico de 50,00 mL. Completou-se o volume do balão com o diluente, aferiu-se o menisco e homogeneizou-se a solução. Transferiu-se a solução para uma seringa e filtrou-se em Filtro de PVDF 0,22 μm para vial. Realizou-se o mesmo preparo para o Padrão Controle afim de avaliar o teste conforme solução padrão. Todos os balões volumétricos utilizados foram protegidos da luz com papel alumínio.

3.2.2. Preparo da matéria-prima

Mediu-se 1,52 g da matéria-prima, utilizando-se papel vegetal, em uma balança analítica. Em seguida, verteu-se a matéria-prima em um tubo de centrifuga de plástico e tampa, previamente revestido externamente com papel alumínio. Acrescentou-se 3,0 mL de Dimetilsulfóxido e 6,0 mL de n-hexano grau HPLC. Em banho ultrassônico previamente aquecido a 60°C, colocou-se o tubo, submetendo o mesmo durante o processo de aquecimento, três vezes a agitação em um vortex por 2,0 minutos.

Após o final de 45 minutos de aquecimento, retirou-se o tubo do banho e levou-o para centrifugar por 10 minutos a 3000 RPM. Com auxílio de uma pipeta, transferiu-se o sobrenadante contendo n-hexano para balão volumétrico de 100 mL. Acrescentou-se mais 6,0 mL de n-hexano no tubo e levou-o para agitação em vortex por 2 minutos. Ao fim da agitação, centrifugou-se por 5 minutos a 3000 RPM. Com auxílio de uma pipeta, transferiu-se o sobrenadante contendo N-hexano para o mesmo balão volumétrico.

Repetiu-se o mesmo processo de extração por mais uma vez. Com auxílio de uma pipeta graduada de 10,00 mL, transferiu-se o sobrenadante contendo n-hexano para o mesmo balão volumétrico. Completou-se o volume do balão volumétrico com n-hexano, aferiu-se o menisco e homogeneizou-se a solução. Transferiu-se a solução para uma seringa descartável e filtrou-se em Filtro de PVDF 0,20 μm para vial.

3.2.3. Condições Cromatográficas

As separações foram realizadas a 25°C com fluxo de fase móvel de 2,00 mL por minuto e as leituras foram realizadas em comprimento de onda de 265 nm. Foi injetado o volume de 20 µL de cada vial preparado.

3.2.3.1. Preparo da Fase Móvel A

Em um balão volumétrico de 2,00 L adicionou-se aproximadamente 500,00 mL de n-hexano grau HPLC, seguido da adição de 800,00 mL de clorofórmio e 2,00 mL de tetrahidrofurano. Completou-se o volume do balão com n-hexano e homogeneizou-o.

Em um frasco “*shot*” de 2,00 L, limpo, seco e identificado transferiu-se a fase móvel preparada no balão volumétrico, homogeneizou-o e levou-se o frasco para o equipamento.

O volume total da fase móvel foi preparado conforme a necessidade de cada corrida analítica.

3.2.3.2. Preparo da Fase Móvel B

Em um balão volumétrico de 2,00 L adicionou-se aproximadamente 500,00 mL de n-hexano grau HPLC, seguido da adição de 10,00 mL de 1-pentanol e 2,00 mL de acetonitrila. Completou-se o volume do balão com n-hexano e homogeneizou-o.

Em um frasco “*shot*” de 2,00 L, limpo, seco e identificado transferiu-se a fase móvel preparada no balão volumétrico, homogeneizou-o e levou-se o frasco para o equipamento.

O volume total da fase móvel foi preparado conforme a necessidade de cada corrida analítica.

3.3. Avaliação da Linearidade do Método

3.3.1. Linearidade

Mediu-se 20,045 mg do padrão de colecalciferol, utilizando-se papel vegetal, em uma balança analítica. Verteu-se o padrão em um balão volumétrico de 50,00 mL com o auxílio de algumas gotas de n-hexano grau HPLC, limpando todo o papel. Em seguida, completou-se o volume do balão com o diluente, aferiu-se o menisco e homogeneizou-

se a solução. Realizou-se o preparo da solução padrão estoque em triplicata, nas mesmas concentrações, de forma independente.

Pipetou-se os volumes de solução padrão estoque para balões de 20,00 mL, descritos na Tabela 1, de acordo com a ordem aleatória da Tabela 2.

Tabela 1: Preparo da curva de calibração.

Nível	Alíquota solução padrão estoque (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração (mg/mL)
1 (50%)	1,00	20,00	0,020
2 (75%)	1,50	20,00	0,030
3 (100%)	2,00	20,00	0,040
4 (125%)	2,50	20,00	0,050
5 (150%)	3,00	20,00	0,060

Tabela 2: Sequência aleatória do preparo da curva de calibração processada pelo software MINITAB®.

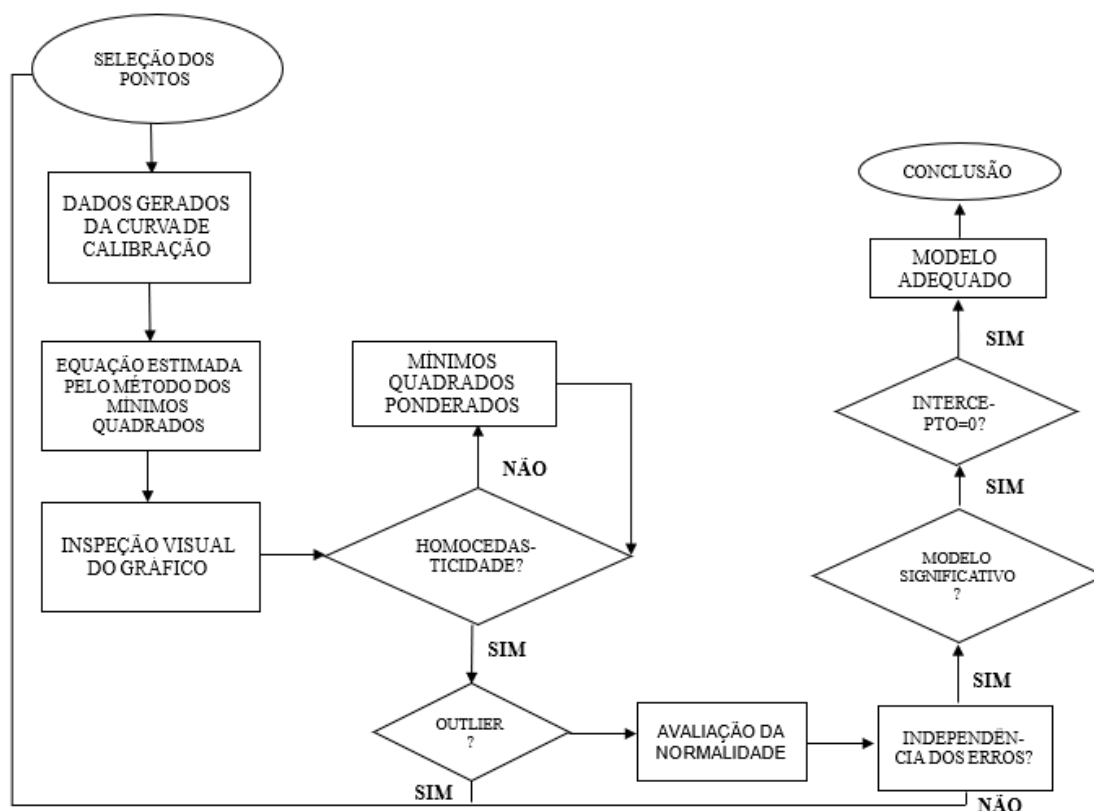
Sequência Aleatória	Alíquota solução padrão estoque (mL)
4 (125%)	2,50
5 (150%)	3,00
1 (50%)	1,00
3 (100%)	2,00
2 (75%)	1,50

Realizou-se a leitura da curva em triplicata para cada grupo (A, B e C) em HPLC adaptado para fase normal e em sequência aleatória processada pelo *software* Minitab®, conforme a Tabela 2.

Após o término das corridas analíticas, processou-se os resultados no HPLC através da integração dos picos, e, em seguida, plotou-se os gráficos e curvas no *software* Minitab® para interpretação dos dados.

Seguiu-se o fluxo de trabalho para aquisição e tratamento dos dados da linearidade, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9.

Figura 9: Fluxograma de avaliação da linearidade.



Fonte: Adaptado (MAPA, 2015).

Selecionou-se os pontos da curva de calibração A, B e C conforme as Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3: Sequência aleatória da curva A da linearidade processada pelo software Minitab®.

Sequência Aleatória Curva A	Pipetagem (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
75 A Rep 02	1,50	30,007
150 A Rep 02	3,00	60,015
75 A Rep 03	1,50	30,007
125 A Rep 01	2,50	50,012
125 A Rep 03	2,50	50,012
100 A Rep 02	2,00	40,010
150 A Rep 03	3,00	60,015
75 A Rep 01	1,50	30,007
150 A Rep 01	3,00	60,015
100 A Rep 01	2,00	40,010
50 A Rep 02	1,00	20,005
100 A Rep 03	2,00	40,010
50 A Rep 01	1,00	20,005
50 A Rep 03	1,00	20,005
125 A Rep 02	2,50	50,012

Tabela 4: Sequência aleatória da curva B da linearidade processada pelo software Minitab®.

Sequência Aleatória Curva B	Pipetagem (mL)	Concentração (µg/mL)
75 B Rep 02	1,50	30,007
150 B Rep 02	3,00	60,015
75 B Rep 03	1,50	30,007
125 B Rep 01	2,50	50,012
125 B Rep 03	2,50	50,012
100 B Rep 02	2,00	40,010
150 B Rep 03	3,00	60,015
75 B Rep 01	1,50	30,007
150 B Rep 01	3,00	60,015
100 B Rep 01	2,00	40,010
50 B Rep 02	1,00	20,005
100 B Rep 03	2,00	40,010
50 B Rep 01	1,00	20,005
50 B Rep 03	1,00	20,005
125 B Rep 02	2,50	50,012

Tabela 5: Sequência aleatória da curva C da linearidade processada pelo software Minitab®.

Sequência Aleatória Curva C	Pipetagem (mL)	Concentração (µg/mL)
125 C Rep 01	2,50	50,012
50 C Rep 03	1,00	20,005
75 C Rep 02	1,50	30,007
150 C Rep 02	2,00	60,015
75 C Rep 03	1,50	30,007
125 C Rep 03	2,50	50,012
100 C Rep 02	2,00	40,010
150 C Rep 03	3,00	60,015
75 C Rep 01	1,50	30,007
150 C Rep 01	3,00	60,015
100 C Rep 01	2,00	40,010
50 C Rep 02	1,00	20,005
100 C Rep 03	2,00	40,010
125 C Rep 02	2,50	50,012
50 C Rep 01	1,00	20,005

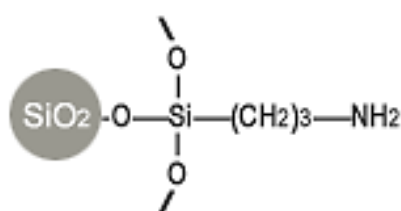
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do Método

4.1.1. Seleção da fase estacionária

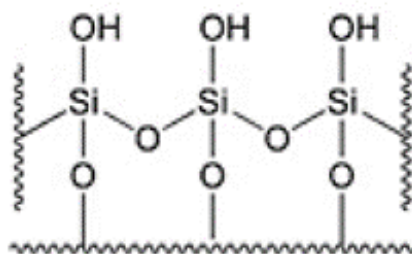
Foram avaliadas as colunas ZORBAX NH₂ com tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poros 70 Angstrom, comprimento 250 mm e diâmetro interno 4,6 mm e Spheri-5 Sílica com tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poros 70 Angstroms, comprimento 250 mm e diâmetro interno 4,6 mm, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 10 e 11, respectivamente.

Figura 10: Estrutura para coluna de aminopropilsilano (NH₂).



Fonte: M&M Instruments Inc.

Figura 11: – Estrutura para coluna de Sílica.



Fonte: Harvest of pure science

O critério de escolha das FE's foi baseado nas farmacopeias americana e britânica para doseamento de colecalciferol, além descrições dos fornecedores Agilent e Waters para as colunas amino e sílica, respectivamente.

Dentre as colunas avaliadas, a coluna amino apresentou menor tempo de retenção, entretanto, a coluna de sílica apresentou melhor resolução quanto ao formato do pico e maior número de pratos teóricos. Sendo assim, foi selecionada para o desenvolvimento do método, uma vez que com o aumento do número de pratos teóricos, aumenta-se o equilíbrio do analito entre as fases estacionária e móvel, portanto a separação é maximizada (LANÇAS, 2009).

Esse fato observado experimentalmente pode ser explicado por meio da equação de van Deemter, que permite comparar diferentes colunas, nesta equação tem-se que quanto menor o valor de H (eficiência de separação), maior será o número de pratos teóricos, maior a eficiência da coluna e o pico tende a um perfil mais fino (DEEMTER, 1956).

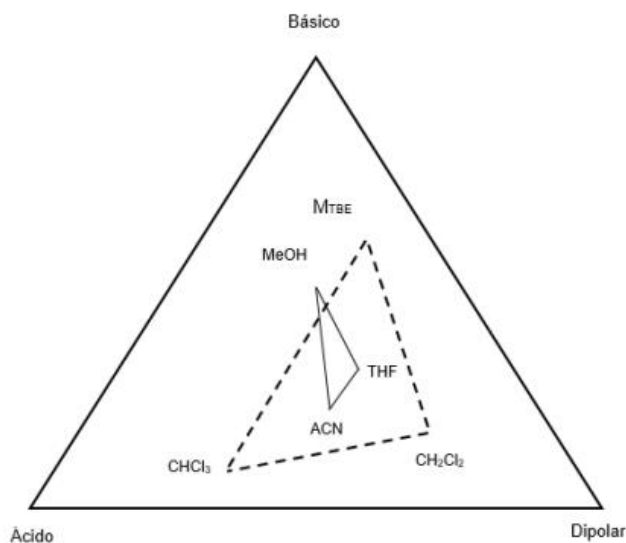
A coluna de sílica possui caráter polar, portanto é a mais indicada fase estacionária para a separação de compostos lipossolúveis como o colecalciferol na cromatografia em fase normal. Além disso, a grande área superficial e a rigidez da sílica suportam pressões elevadas da fase móvel, o que permite o uso de fluxos elevados. Entretanto, o uso da sílica é limitado na presença de água em fases móveis apolares, uma vez que a água adsorvida forma uma camada ao redor da partícula, dessa forma, a água é capaz de fechar seus poros e desativar a superfície da sílica, o que pode causar aumento de retenção, alargamento dos picos e o aparecimento de caudas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.1.2. Seleção da fase móvel

De acordo com (LANÇAS, 2009) a fase normal é caracterizada pelo emprego de fases móveis apolares ou pouco polares em relação a coluna utilizada, portanto, foram selecionadas duas fases móveis apolares para o desenvolvimento do método, a primeira composta por de 59,9% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,1% de tetrahydrofurano, e a segunda fase móvel composta pela proporção de 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila.

Para a escolha dos solventes, recorreu-se ao método do triângulo proposto por Snyder, que estabelece a classificação da propriedade do solvente em termos de polaridade e interações químicas específicas. A vantagem do esquema de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação que eles possuem, dessa forma, os solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar valores de polaridade diferentes (SNYDER, 1979). A Figura 12 apresenta o triângulo proposto por Snyder.

Figura 12: Triângulo de seletividade para os solventes preferidos em: — fase reversa, ----- fase normal. MeOH: metanol; ACN: acetonitrila; THF: tetrahidrofurano, MTBE: éter metil terc-butílico; CHCl₃: clorofórmio; CH₂Cl₂: cloreto de metileno.



Fonte: COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006

Para interpretar o triângulo de solventes, primeiro é necessário partir das características de polaridade do analito. Em seguida, é preciso identificar se o analito de interesse é básico, ácido ou dipolar, e a partir dessas informações, é possível compor e testar as diferentes proporções de FM (SNYDER, L., KIRKLAND, J., DOLAN, J. 2010) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

A molécula de colecalciferol apresenta pH básico e o coeficiente de partição (log P) de 7,125, que indica que a molécula possui característica apolar, Tabela 6.

Tabela 6: Valores de pH e log P para a molécula de colecalciferol.

Colecalciferol	
pH	7,4
log P	7,125

Fonte: CHEMICALIZE.

Dessa forma, a força da fase móvel foi avaliada de acordo com o índice de polaridade, P' , dos solventes selecionados, Tabela 7.

Tabela 7: Valores de polaridade para solventes utilizados em HPLC FN.

Solvente	<i>P'</i>
Hexano	0,1
Clorofórmio	4,1
Tetrahidrofurano	4,0
1-pentanol	4,0
Acetonitrila	5,8

Fonte: SNYDER, 1979

Após a seleção primária dos solventes que permitiram a separação com maior seletividade, realizou-se as corridas para inspeção visual e avaliação dos cromatogramas. A escolha da proporção dos solventes constituídos na fase foi feita por meio de testes experimentais, no qual os cromatogramas obtidos para a fase composta por 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila apresentaram os melhores resultados. O cromatograma referente ao padrão e matéria prima são apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13: Cromatograma referente ao padrão de colecalciferol empregando-se a fase contendo 99,4% de N-Hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila e coluna de sílica.

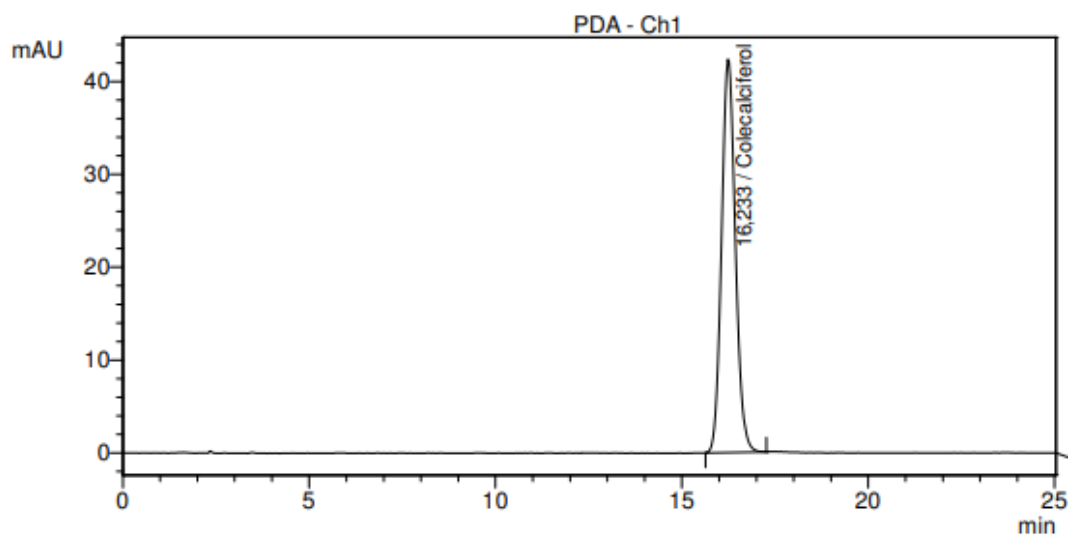
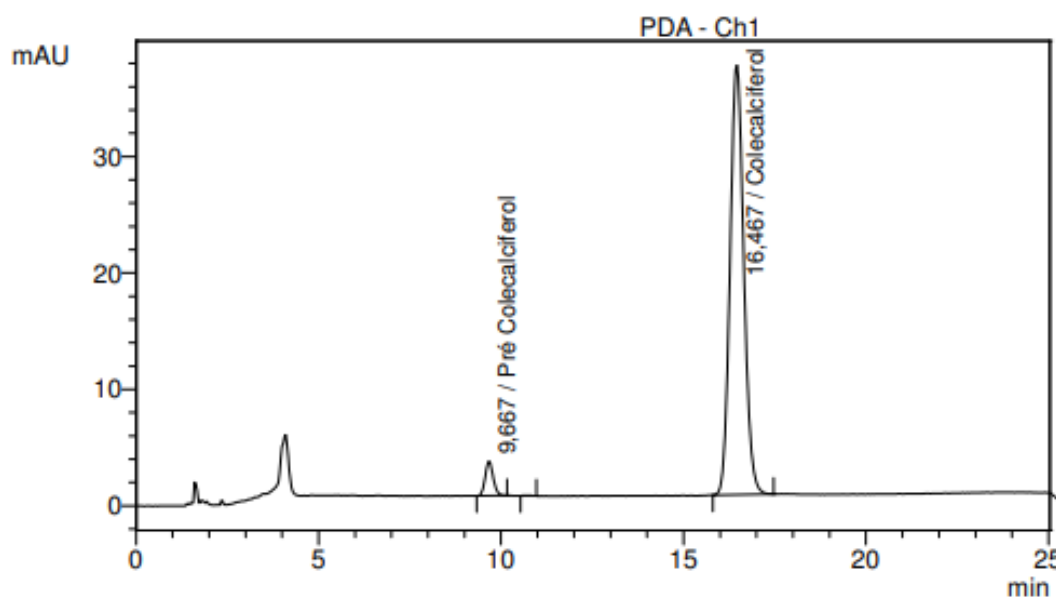


Figura 14: Cromatograma referente a matéria prima de colecalciferol empregando-se a fase contendo 99,4% de N-Hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila e coluna de sílica.



De acordo com os cromatogramas obtidos, observa-se que pico referente ao colecalciferol elui em aproximadamente 16 minutos, o pico referente ao pré colecalciferol elui em aproximadamente 9 minutos e o dl- α -tocoferol, adicionado como conservante e antioxidante da matéria prima, elui com aproximadamente 2 minutos. As estruturas moleculares estão dispostas nas Figuras 15, 16, 17, conforme a ordem de eluição dos analitos. O colecalciferol é a molécula apolar entre os analitos, portanto, permanece retida por mais tempo pela fase móvel que possui caráter apolar.

Figura 15: Estrutura molecular do dl- α -tocoferol (vitamina E).

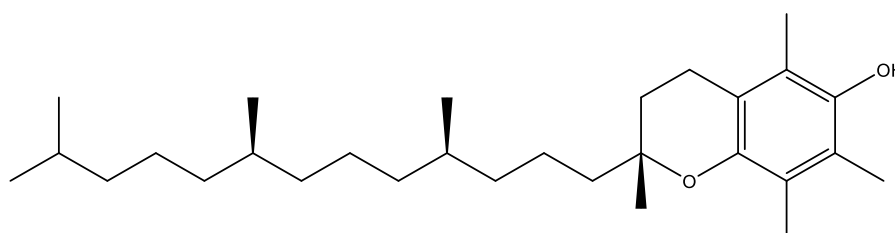


Figura 16: Estrutura molecular do pré colecalciferol (pré vitamina D₃).

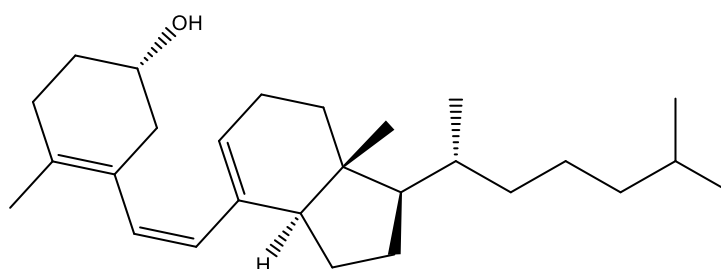
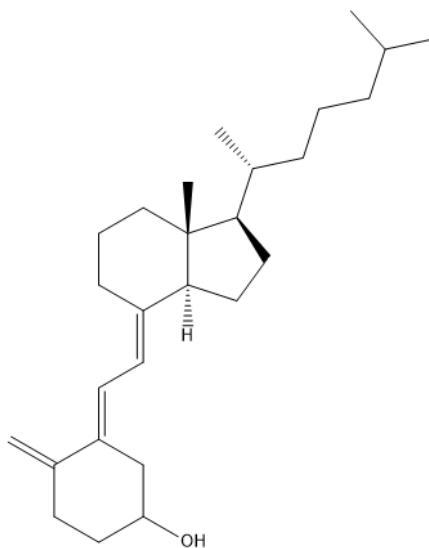


Figura 17: Estrutura molecular do colecalciferol (vitamina D₃).

Nesta FM, emprega-se o hexano como solvente de base para ajustar a polaridade da fase móvel, o 1-pentanol comportou-se como melhor modificador da fase móvel frente ao clorofórmio, em razão de sua boa estabilidade nas condições utilizadas pela técnica, dessa forma o tempo de retenção tornou-se estável, ao passo que o clorofórmio sofre decomposição lenta na presença da luz, o que requer a adição de estabilizantes (LANÇAS, 2009). Além disso, a toxicidade e problemas ambientais foram considerados para a substituição do orgânico clorado.

Como aditivo a FM emprega-se a acetonitrila, esta comporta-se como modificador polar em baixa concentração. O uso desse modificador é benéfico pois resulta em menor variação no tempo de retenção de uma corrida para outra e um aumento substancial na capacidade da coluna, devido ao aumento da linearidade das isotermas de adsorção (LANÇAS, 2009). Além disso, é capaz de reduzir cauda de picos e decomposição da amostra, tais benefícios são fruto da adsorção preferencial da acetonitrila pelos sítios ativos na superfície do adsorvente, conduzindo a uma nova superfície desse adsorvente (TSWETT, 1906).

Os cromatogramas obtidos para a fase composta por 59,9% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,1% de tetrahydrofurano, referente ao padrão e matéria prima são apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Figura 18: Cromatograma referente ao padrão de colecalciferol empregando-se a fase contendo 59,9% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,1% de tetrahydrofurano e coluna amino.

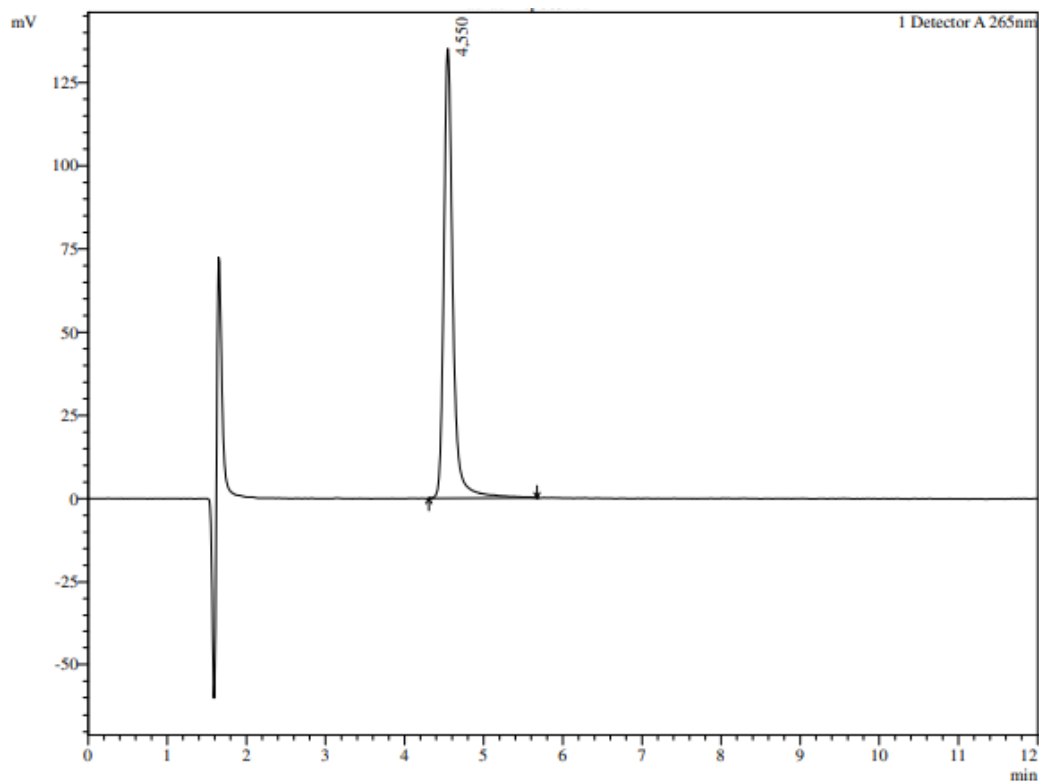
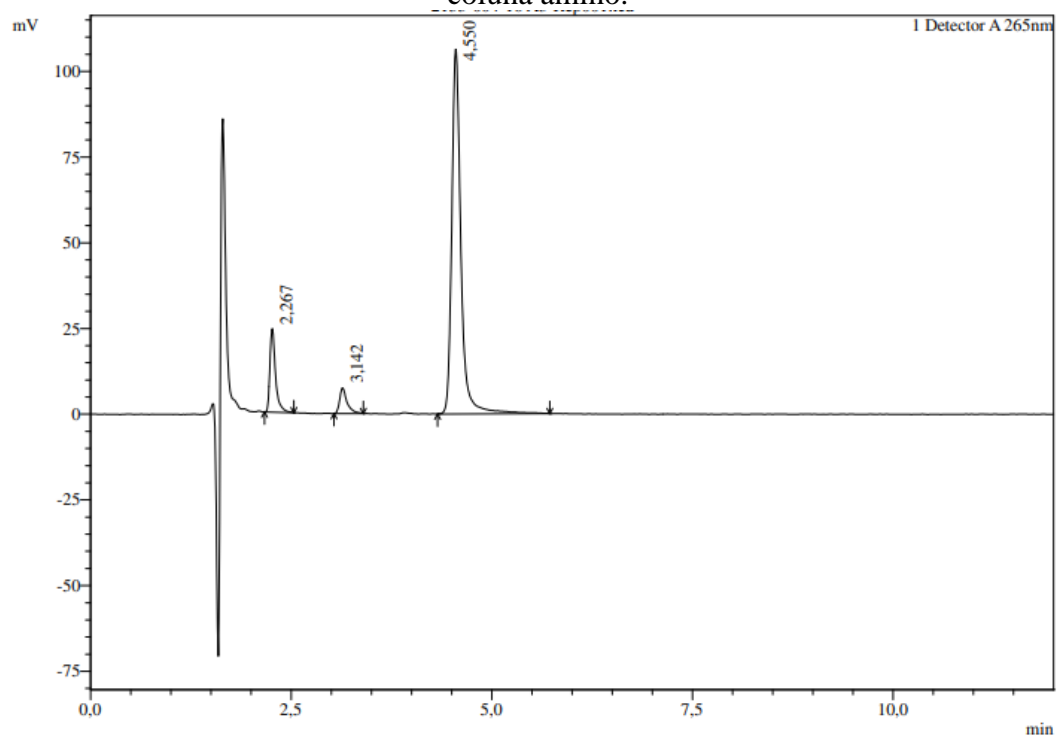


Figura 19: Cromatograma referente a matéria prima de colecalciferol empregando-se a fase contendo 59,9% de n-hexano, 40% de clorofórmio e 0,1% de tetrahydrofurano e coluna amino.



De acordo com os cromatogramas obtidos, observa-se presença de cauda, pico negativo e menor estabilização da linha de base. Além disso, observou-se grande variação no tempo de retenção de uma corrida para outra e demanda de maior tempo de estabilização da coluna aminopropilsilano. Frente a isso, selecionou-se a FM contendo 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol, 0,1% de acetonitrila e coluna de sílica para o desenvolvimento e validação do método.

4.2. Avaliação da Linearidade do Método

4.2.1. Seleção dos pontos

Para a obtenção de um resultado satisfatório na condução do estudo realizou-se o planejamento da curva de calibração. Para isso, fez-se o estudo das vidrarias volumétricas e pipetas necessárias, além da quantidade de SQR suficiente para o estudo e a disponibilidade dos equipamentos requeridos.

Definiu-se relação linear a ser avaliada nas concentrações de 50%, 75%, 100%, 125% e 150% , considerando-se três preparos diferentes de padrões, para cada nível de calibração das curvas A, B e C, uma vez que maioria das respostas das amostras em teste devem conter concentrações em direção ao centro da curva (BARWICK, 2003).

Para obter-se uma regressão linear ideal utilizou-se pontos da curva equidistantes entre si, além disso, uma amostra com 45 eventos para realização dos cálculos estatísticos (MAPA, 2015).

Realizou-se o preparo e leitura de cada evento de maneira independente e aleatória, com isso, os erros sistemáticos inerentes a erros pessoais, operacionais e instrumentais são minimizados. Dessa forma, são avaliados os erros aleatórios ou indeterminados inerentes ao sistema (SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S. R, 2006).

De acordo com VUOLO, 1992) os erros aleatórios, diferente dos erros sistemáticos, podem ser quantificados por análise estatística, portanto o efeito dos erros aleatórios sobre uma determinada quantidade sob investigação podem geralmente ser determinados.

4.2.2. Dados gerados da curva de calibração

A partir do processamento dos cromatogramas gerados no equipamento conforme o *Report* disposto no ANEXO B, realizou-se a transferência dos dados para o

software Minitab® e, em seguida, realizou-se inspeção visual dos dados obtidos para área e resíduos, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Dados da curva de calibração da Linearidade.

Sequência Aleatória	Pipetagem (mL)	Concentração (µg/mL)	Área	Resíduos
75 A Rep 02	1,50	30,007	815087	-3776,37
150 A Rep 02	3,00	60,015	1640534	-580,00
75 A Rep 03	1,50	30,007	817957	-906,37
125 A Rep 01	2,50	50,012	1360175	-6855,46
125 A Rep 03	2,50	50,012	1366949	-81,46
100 A Rep 02	2,00	40,010	1092591	-355,91
150 A Rep 03	3,00	60,015	1643648	2534,00
75 A Rep 01	1,50	30,007	817998	-865,37
150 A Rep 01	3,00	60,015	1647670	6556,00
100 A Rep 01	2,00	40,010	1090326	-2620,91
50 A Rep 02	1,00	20,005	547925	3145,18
100 A Rep 03	2,00	40,010	1095170	2223,09
50 A Rep 01	1,00	20,005	545901	1121,18
50 A Rep 03	1,00	20,005	548672	3892,18
125 A Rep 02	2,50	50,012	1365038	-1992,46
75 B Rep 02	1,50	30,007	817793	-1070,37
150 B Rep 02	3,00	60,015	1642272	1158,00
75 B Rep 03	1,50	30,007	816581	-2282,37
125 B Rep 01	2,50	50,012	1360851	-6179,46
125 B Rep 03	2,50	50,012	1361477	-5553,46
100 B Rep 02	2,00	40,010	1090926	-2020,91
150 B Rep 03	3,00	60,015	1640804	-310,00
75 B Rep 01	1,50	30,007	819525	661,63
150 B Rep 01	3,00	60,015	1641980	866,00
100 B Rep 01	2,00	40,010	1094577	1630,09
50 B Rep 02	1,00	20,005	545378	598,18
100 B Rep 03	2,00	40,010	1090286	-2660,91
50 B Rep 01	1,00	20,005	545022	242,18
50 B Rep 03	1,00	20,005	547425	2645,18
125 B Rep 02	2,50	50,012	1365346	-1684,46
125 C Rep 01	2,50	50,012	1364677	-2353,46
50 C Rep 03	1,00	20,005	543695	-1084,82
75 C Rep 02	1,50	30,007	818538	-325,37
150 C Rep 02	2,00	60,015	1645975	4861,00
75 C Rep 03	1,50	30,007	819459	595,63
125 C Rep 03	2,50	50,012	1366163	-867,46
100 C Rep 02	2,00	40,010	1090759	-2187,91
150 C Rep 03	3,00	60,015	1645323	4209,00
75 C Rep 01	1,50	30,007	817457	-1406,37

Continuação da Tabela 8: Dados da curva de calibração da Linearidade.

Sequência Aleatória	Pipetagem (mL)	Concentração (µg/mL)	Área	Resíduos
150 C Rep 01	3,00	60,015	1645627	4513,00
100 C Rep 01	2,00	40,010	1094643	1696,09
50 C Rep 02	1,00	20,005	546546	1766,18
100 C Rep 03	2,00	40,010	1093258	311,09
125 C Rep 02	2,50	50,012	1366638	-392,46
50 C Rep 01	1,00	20,005	547969	3189,18

De acordo com os valores obtidos para a área observa-se que os dados possuem coerência de grandeza entre as respectivas concentrações. Por tratar-se de muitos eventos, fez-se por meio da função estatística descritiva básica no Minitab® a avaliação de cada resultado em seus respectivos níveis de concentração, para isso, calcula-se pelo *software* o número de níveis, média, desvio padrão, variância, coeficiente de variação e os valores de mínimo e máximo, conforme a Figura 20.

Figura 20: Estatísticas descritivas para inspeção visual dos dados.

Variável	Concentração								
	(ug/mL)	N	N*	Média	DesvPad	Variância	CoefVar	Mínimo	Máximo
Área	20,005	9	0	546504	1637	2679248	0,30	543695	548672
	30,007	9	0	817822	1383	1912026	0,17	815087	819525
	40,010	9	0	1092504	1992	3969326	0,18	1090286	1095170
	50,012	9	0	1364146	2608	6800277	0,19	1360175	1366949
	60,015	9	0	1643759	2517	6332885	0,15	1640534	1647670

Fonte: *software* Minitab®

Dessa forma, garante-se por meio da inspeção visual dos dados, a ausência de dados incorretos ou de dados faltantes.

4.2.3. Método dos mínimos quadrados (MMQ)

Segundo (GARNÉS; SAMPAIO; DALMOLIN, 1997) quando um conjunto de dados que exprime a relação entre as variáveis do sistema é obtido a partir de um experimento, os valores podem conter erros inerentes e imprevisíveis. Neste caso, surge a necessidade de se ajustar curvas a estes dados, ou seja, deve-se procurar uma função de aproximação que melhor represente a característica deste conjunto.

O método mais empregado para obter-se corretamente essa máxima proximidade é o MMQ, que fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima, dentro de certas suposições de natureza estatística (BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A., 2002).

O ajuste dos parâmetros pelo MMQ consiste em determinar os valores a e b que minimizam a soma das diferenças quadráticas entre a reta e os pontos experimentais divididas pelas respectivas variâncias (HELENE, 2013).

O método a ser aplicado na estimação da curva de calibração segue os parâmetros conforme disposto no Quadro 2.

Quadro 2: Critério de decisão para o método de estimação da curva.

Método dos mínimos quadrados	
Se a variância de y for constante	Recomendável utilizar MMQO ¹
Se são observadas alterações de variância de y	Recomendável utilizar MMQP ²

Fonte: ANVISA, 2017a

A relação linear entre a variável aleatória y e a variável não aleatória x encontrada é descrita pela função:

$$y = -3387 + 27402x$$

Onde os valores encontrados são as estimativas dos parâmetros do modelo, obtidas na etapa descritiva da calibração. As diferenças entre os valores observados e os valores estimados são os resíduos. Para este modelo, considera-se que os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações na variável dependente y, o sinal analítico.

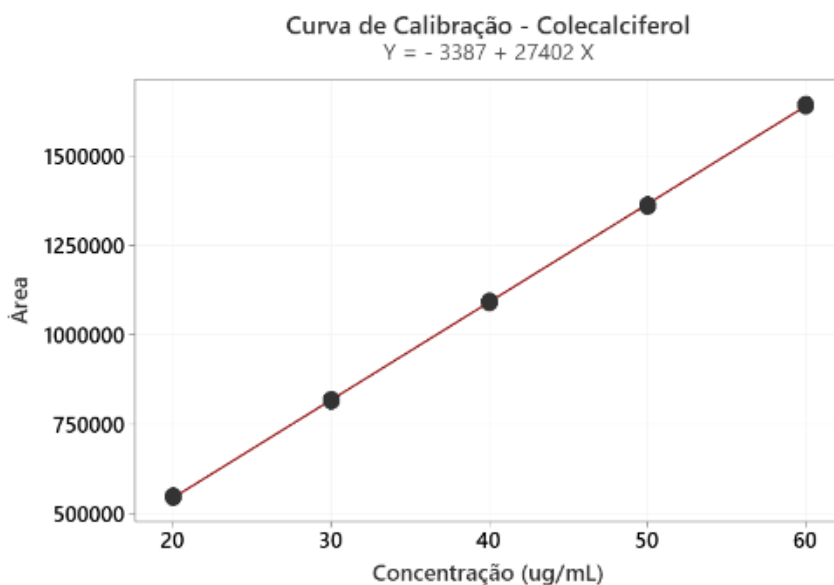
4.2.4. Inspeção Visual da Curva

A análise visual tem o como objetivo, observar se os pontos, quando dispostos no gráfico, possuem relação linear aparente. Embora essa análise visual não seja comprobatória, a mesma deve preceder o uso de qualquer modelo estatístico, pois, neste caso, nenhum modelo poderá ser usado se a relação for visivelmente não linear, o que pode demonstrar que a resposta analítica não é adequada ou que necessita de transformação matemática (ANVISA, 2017a). O gráfico obtido para o modelo encontra-se disposto na Figura 21.

¹ MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários.

² MMQP – Método dos mínimos quadrados ponderados.

Figura 21: Gráfico da curva de calibração.



Fonte: *software* Minitab®

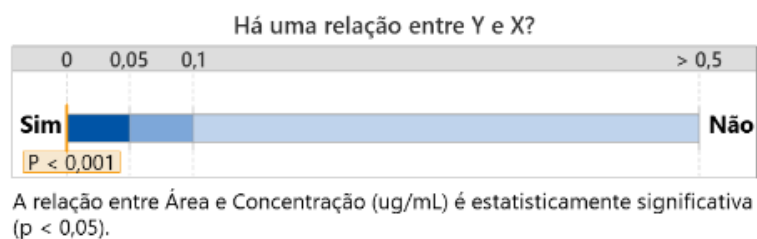
A partir da inspeção visual do gráfico da reta de calibração verifica-se a qualidade da curva apropriada para modelo linear.

4.2.4.1 Avaliação dos Coeficientes de Correlação (R) e Determinação (R^2)

O coeficiente de correlação de Pearson (R) é uma medida de associação linear entre variáveis em que a correlação mensura a direção e o grau da relação linear entre duas variáveis quantitativas (MOORE, 2007).

O modelo linear supõe que existe uma relação estatisticamente significativa entre y e x (MOORE; McCABE, 2004). Os dados gerados pelo *software* Minitab® apresentam-se na Figura 22.

Figura 22: Relação entre área e concentração.



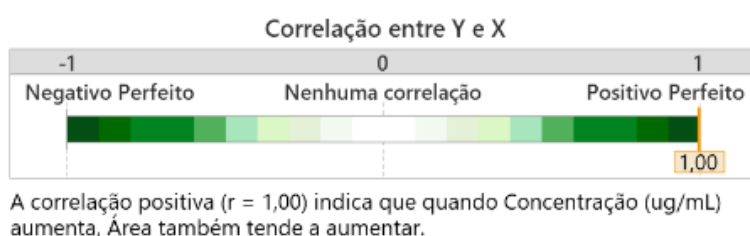
Fonte: *software* Minitab®

Verifica-se que pela avaliação do *software* que no modelo proposto o aumento ou decréscimo de uma unidade da variável área, descrita por y, gera o mesmo impacto na concentração, descrita por x.

O coeficiente de correlação Pearson (R) varia de -1 a 1, e o sinal indica a direção positiva ou negativa, esse valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o escore de uma variável pode ser determinado exatamente ao se saber o escore da outra (ALDRICH, 1995), (HAIG, 2007), (KOZAK, 2009).

A avaliação do coeficiente de correlação gerada *software* Minitab® apresenta-se na Figura 23.

Figura 23: Coeficiente de correlação de Pearson (R).



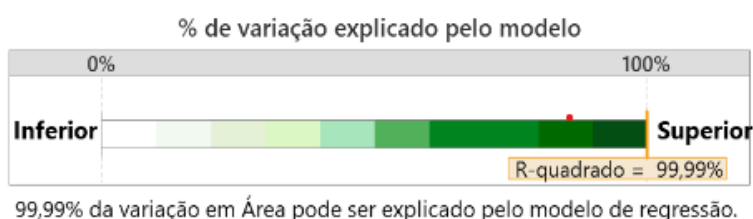
Fonte: *software* Minitab®

Verifica-se uma correlação positiva que indica que há relação linear entre as variáveis, uma vez que, quanto mais perto de 1, maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis.

O coeficiente de determinação é uma medida estatística de quão próximos os dados estão da linha de regressão ajustada, ele indica a porcentagem da variação da variável resposta que é explicada por um modelo linear (ANDERSON; SWEENEY; WILLIAMS, 2002).

A avaliação do coeficiente de determinação gerada *software* Minitab® apresenta-se na Figura 24.

Figura 24: Coeficiente de Determinação (R^2).



Fonte: *software* Minitab®

Verifica-se, a partir do coeficiente de determinação, que o modelo explica 99,99% da variabilidade dos dados de resposta ao redor de sua média.

Em termos de modelo, o R^2 não indica se as estimativas e predições são tendenciosas, portanto, outros testes estatísticos são necessários para avaliar essa tendência, como por exemplo a análise de resíduos (CALLEGARI SM, 2003).

4.2.5. Teste de Cochran

A variância constante ou homocedasticidade é um requisito necessário para a análise de variância (ANOVA). O método dos mínimos quadrados ordinários é recomendado quando a variância é constante e não há fator de ponderação. Caso sejam observadas alterações na variância e um fator de ponderação, utiliza-se o método dos mínimos quadrados ponderados, pois a estimação dos componentes de variância é fortemente afetada. Dessa forma, dependendo do grau de severidade da heterogeneidade das variâncias, a análise de variância pode ter sua significância estatística comprometida (MILLIKEN; JOHNSON, 1992).

Uma vez que os dados foram ajustados ao modelo de regressão linear ($y = a + bx$), submeteu-se a curva de calibração ao teste de Cochran para avaliar o desvio bilateral das variâncias a um nível de significância de 5%. Este teste destina-se a avaliar a homogeneidade das variâncias, o que permite utilizar a curva de calibração obtida com um limite de confiança aceitável (COCHRAN; COX, 1957). Os resultados estão apresentados na Tabelas 9.

Tabela 9: Valores de C calculado e C crítico.

Valor de C calculado	Valor de C crítico
0,313467	0,4027

O teste de Cochran compara a maior variância com as demais, o valor de C é calculado considerando-se o maior valor de variância dividido pela soma de todas as variâncias obtidas. O valor C crítico é avaliado de acordo com a tabela de Cochran para um nível de significância de 95%, neste caso, tem-se que o valor de k é 9 para um n=3. A tabela para consulta encontra-se disponível no ANEXO 4.

Para a avaliação dos dados obtidos segue-se o critério de decisão do teste estatístico, de acordo com a Quadro 3.

Quadro 3: Critério de decisão para o Teste de Cochran.

Teste de Cochran		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
Hipótese nula (H₀): Não existe diferença significativa entre as variâncias.	Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{Crítico}}$, aceita-se a hipótese nula (H ₀).	Não há diferença estatística significativa entre as variâncias (situação denominada homocedasticidade)
Hipótese alternativa (H₁): Existe diferença significativa entre as variâncias.	Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{Crítico}}$, rejeita-se a hipótese nula (H ₀).	Há diferença estatística significativa entre as variâncias (situação denominada heterocedasticidade)

Fonte: COCHRAN; COX, 1957

Verifica-se que o valor de Cochran calculado foi inferior ao valor de Cochran tabelado, portanto, aceita-se a hipótese nula, ou seja, não existe diferença significativa entre as variâncias, o que demonstra a homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade, conforme o aumento da concentração. Este resultado indica que ao longo da faixa de concentração estudada o modelo tem um comportamento homocedástico. Como o teste mostrou que as variâncias são estatisticamente equivalentes, conclui-se que as curvas de calibração podem ser determinadas através da regressão linear e o modelo aplicado deve ser o dos múltiplos quadrados ordinários.

4.2.6. ANOVA

A análise de variância é uma ferramenta estatística que, dentre outros objetivos, é utilizada para estimar as diferentes causas de variação nos resultados analíticos. Utiliza-se a ANOVA fator único para estimar a homogeneidade de uma amostragem, assim como para estimar a variância dos valores utilizados na regressão linear.

Neste caso, tem-se uma variável categórica x explicativa do modelo e as medições da variável resposta y . A comprovação da significância do coeficiente angular é fundamental para que seja demonstrada a linearidade do método, essa avaliação é realizada por meio do teste F da Anova, assim, a avaliação do coeficiente angular permite avaliar se o valor de y efetivamente varia em função de x (VIEIRA, 2006). A Figura 25 apresenta os valores do F tabelado e do F calculado.

Figura 25: Análise de variância gerada pelo Minitab®.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	6,76096E+12	6,76096E+12	833690,99	0,000
conc	1	6,76096E+12	6,76096E+12	833690,99	0,000
Erro	43	348715973	8109674		
Falta de ajuste	3	175165884	58388628	13,46	0,000
Erro puro	40	173550090	4338752	*	*
Total	44	6,76131E+12			

Fonte: *software* Minitab®

Tabela 10: Valores de F tabelado e F calculado.

F Tabelado	F Calculado
4,06704	833691

A ANOVA usa o teste F para determinar se a variabilidade entre as médias do grupo é maior que a variabilidade das observações dentro dos grupos. Se essa proporção for suficientemente grande, pode-se concluir que nem todas as médias são iguais (NETER; KUTNER; NACHTSHEIM; WASSERMAN, 2016). A avaliação da inclinação da curva e do intercepto seguem os critérios de decisão, conforme o Quadro 4.

Quadro 4: Avaliação da inclinação da curva.

Avaliação da inclinação		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
H₀: b=0	$F_{calculado} \geq F(\alpha, 1, n-2)^*$, \Rightarrow rejeita-se a hipótese nula.	Rejeita-se a hipótese de que b=0 e assume-se que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear.
H₁: b≠0	$F_{calculado} < F(\alpha, 1, n-2)^*$, \Rightarrow aceita-se a hipótese nula.	Aceita-se a hipótese de que b=0.

O F tabelado (0,05; 1; n-2) possui distribuição de probabilidade F de Snedecor com 1 grau de liberdade no numerador e n-2 graus de liberdade no denominador ao nível de significância de 5%. Dessa forma, verifica-se que o F calculado é maior que o F tabelado, ANEXO 5, portanto, aceita-se a hipótese nula, o que demonstra que existe diferença significativa entre a média do intercepto e a média da inclinação da reta pelo teste ANOVA em nível de significância de 5%.

A avaliação do intercepto permite determinar se na rotina de análise, para execução do método analítico em questão, deve ser padronizado o uso de uma curva de calibração ou de um ponto único. O Quadro 5 apresenta os critérios de decisão para avaliação do intercepto.

Quadro 5: Avaliação do intercepto da curva.

Avaliação do intercepto		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
H₀: b=0	p-valor $\leq 0,05 \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula	O intercepto é diferente de zero ao nível de significância de 5%
H₁: b\neq0	p-valor $> 0,05 \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula	O intercepto é igual a zero ao nível de significância de 5%.

O valor-p obtido para a interseção no teste ANOVA foi de 0,11063, portanto aceita-se a hipótese nula de que o intercepto é igual a zero ao nível de significância de 5%. Sendo assim, a curva que representa a linearidade do método pode ser quantificada com ponto único na rotina do laboratório, pois o segundo ponto para traçar a reta é representado pela origem (0,0). A linearidade do método precisará ser reavaliada quando o valor do coeficiente linear for estatisticamente diferente de zero e tiver magnitude significativa para o sinal analítico na concentração de trabalho.

4.2.7. Avaliação dos Resíduos

4.2.7.1. Teste de Outlier

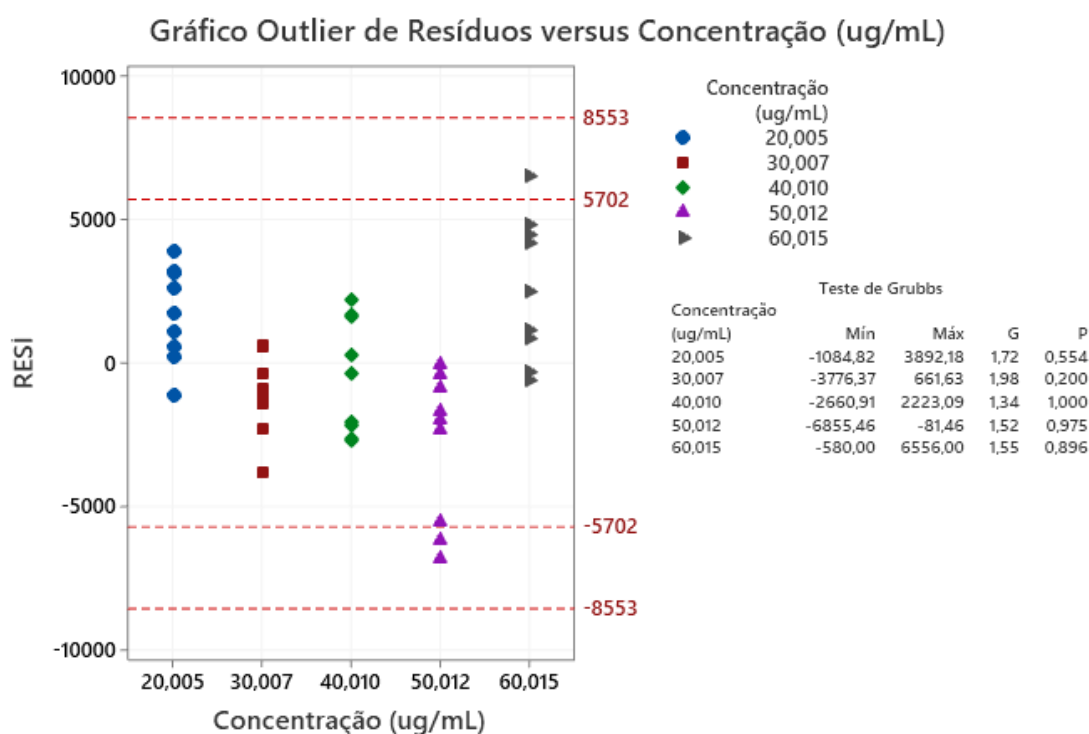
De acordo com (GRUBBS, 1969) outlier é definido como uma observação periférica que pode ter origens distintas, pode estar relacionado a uma manifestação extrema da variedade aleatória inerente aos dados ou ser resultado de um desvio grosseiro do procedimento experimental. Portanto, os outliers podem ser entendidos como observações inconsistentes quando comparados à maioria dos dados.

O teste de Grubbs verifica a presença de valores extremos em observações amostrais, esses valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, ou podem ser inerentes a um erro no cálculo durante o recolhimento dos dados (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009). O Quadro 6 apresenta os critérios de decisão para o teste de *outlier*.

Quadro 6: Critério de decisão para teste de outlier.

Teste de <i>Outlier</i>		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
H₀: todos os valores de dados provêm da mesma distribuição normal	p-valor $\leq 0,05 \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula	Existe um outlier.
H₁: o menor ou o maior valor dos dados é um outlier	p-valor $> 0,05 \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula	Não há evidências suficientes para concluir que existe um outlier.

O Minitab[®] usa a estatística de teste de Grubbs para calcular o valor de p, que é o nível descritivo do teste dado pela probabilidade de se rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira. O teste estatístico de Grubbs (G) é calculado pela diferença entre a média da amostra e o maior ou menor valores de dados, dividido pelo desvio padrão. A Figura 26 apresenta os dados obtidos através do *software* Minitab[®].

Figura 26: Gráfico de *outlier* dos resíduos *versus* a concentração.

Fonte: *software* Minitab[®]

Verifica-se que os valores de p obtidos para o teste de Grubbs correspondem a valores maiores que o nível de significância do teste (0,05), este valor é o nível de risco máximo aceitável para rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira. Dessa forma, aceita-se a hipótese nula de que não há evidências suficientes para concluir que existe

um outlier no conjunto de dados. Isto sugere que a média e a mediana não são afetadas pelos valores atípicos encontrados entre dois a três desvios padrões, pois o teste de Grubbs possui poder suficiente para detectar um *outlier* neste modelo.

4.2.7.2. Teste de Anderson-Darling

A verificação da normalidade dos dados é utilizada para determinar qual teste estatístico será empregado, muitos dos procedimentos estatísticos são testes paramétricos, os quais requerem que os dados sejam retirados de uma população normalmente distribuída (FIELD, 2009).

Para que o teste aplicado seja preciso, deve-se utilizar o teste estatístico que apresente uma boa representação dos dados coletados. Dessa forma, a aderência do modelo ou o grau com que o modelo estatístico representa os dados deve ser adequado ao conjunto de testes utilizados (ANDERSON, D. R.; SWEENEY, D. J. & WILLIAMS, T. A., 2002).

Sendo assim, para verificar a suposição da normalidade dos dados aplica-se o teste de Anderson-Darling, segue-se os critérios de decisão do teste de acordo com o Quadro 7.

Quadro 7: Critério de decisão para teste de normalidade.

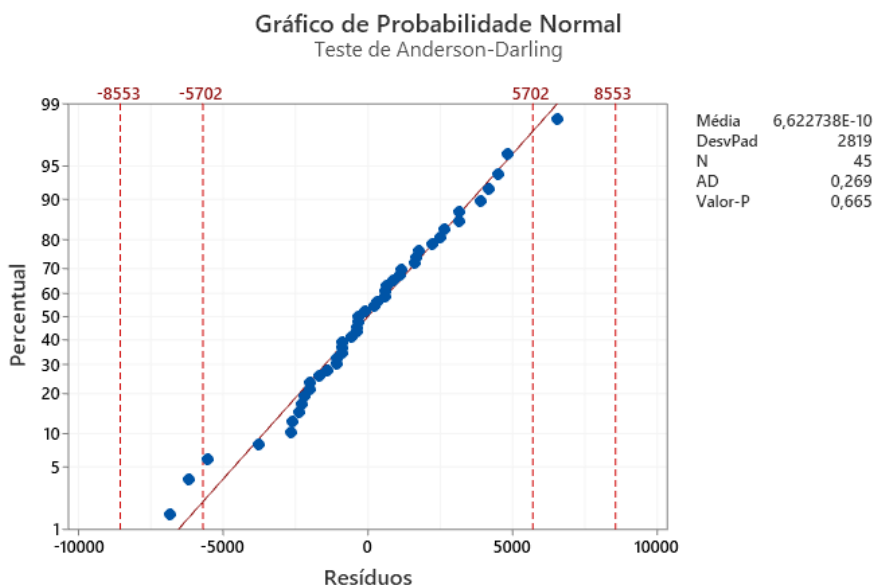
Teste de Anderson-Darling		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
H₀: os dados seguem distribuição normal	p-valor $\leq 0,05 \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula.	Os dados não seguem distribuição normal.
H₁: os dados não seguem distribuição normal	p-valor $> 0,05 \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula.	Os dados seguem distribuição normal.

A estatística de Anderson-Darling mede o quão bem os dados seguem uma distribuição em particular. Para um conjunto de dados e distribuição especificados, quanto melhor a distribuição se ajusta aos dados, menor será essa estatística. Se o valor de p for menor que um alfa escolhido, rejeita-se a hipótese nula de que os dados seguem uma distribuição normal.

O *software* Minitab[®] calcula a estatística de Anderson-Darling usando a distância ao quadrado ponderada entre a linha ajustada do gráfico de probabilidade e a função de etapa não-paramétrica. O cálculo é ponderado mais fortemente nas caudas da

distribuição. A Figura 27 apresenta o gráfico de probabilidade normal e o valor-p obtidos.

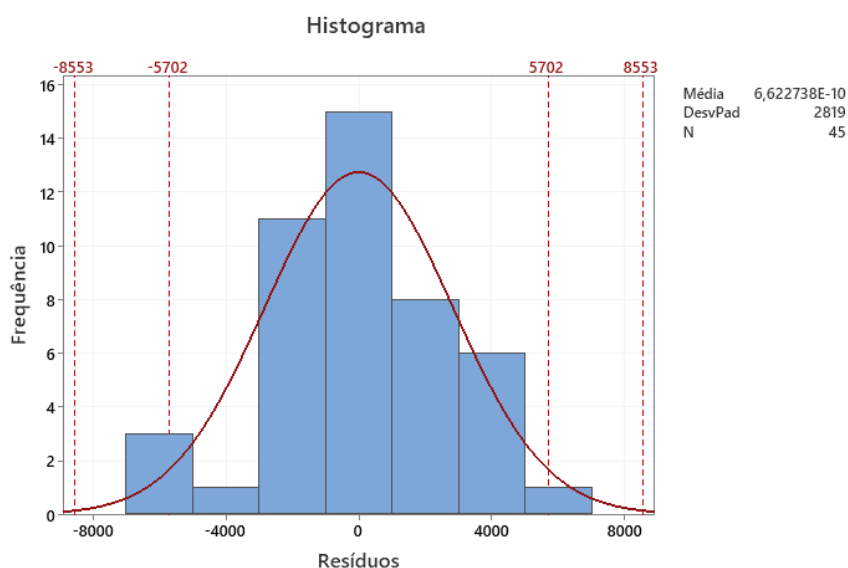
Figura 27: Gráfico de probabilidade normal.



Fonte: *software* Minitab®

Verifica-se que os dados seguem uma distribuição normal uma vez que o valor-p calculado é maior que 0,05, portanto, aceita-se a hipótese nula de que os dados estão normalmente distribuídos. Como as análises nas etapas seguintes envolvem testes de hipóteses e construção de intervalos de confiança, desvios da normalidade afetam o nível de significância e, conseqüentemente, o poder do teste. Dessa forma, uma vez que verificação da normalidade é observada, realiza-se a análise de resíduos através do histograma, cujo comportamento em relação à normalidade deseja-se verificar. O histograma é apresentado na Figura 28.

Figura 28: Histograma para distribuição normal.



Fonte: *software* Minitab®

Através do histograma dos resíduos verifica-se que a pressuposição de normalidade é satisfeita, o gráfico se parece com o gráfico de uma amostra de distribuição normal centrada na origem. Cerca de 95% das observações estão dentro de dois desvios padrões da média, entre -5702 e 5702, assim, conclui-se que menos de 5% (0,05) das observações estão fora desta amplitude. Por se tratar de uma amostra com 45 eventos, flutuações podem ocorrer, por isso o aparente afastamento da normalidade não implica necessariamente em uma violação séria desse pressuposto (MONTGOMERY, 1977).

De acordo com a premissa de normalidade dos erros confere maior eficiência aos estimadores e possibilita inferências estatísticas, através da aplicação de testes de hipótese. A justificativa teórica para inclusão desta premissa está relacionada com a interpretação do termo aleatório e o Teorema Central do Limite (TCL). Uma vez que o termo aleatório representa a influência combinada de um grande número de variáveis não incluídas explicitamente no modelo. O TCL demonstra que a distribuição da soma de um grande número de variáveis aleatórias independentes com mesma distribuição, tende a uma gaussiana na medida em que o número de variáveis aumenta (BUSSAB; MORETTIN, 2002) (CASELLA; BERGER, 2010).

4.2.7.3. Teste de Igualdade de Variâncias

A hipótese de homogeneidade de variâncias é o pressuposto mais importante da análise de variâncias. A violação de qualquer outra suposição pode resultar em

heterogeneidade do erro experimental, e isso reforça ainda mais a necessidade de seu estudo e controle do erro tipo I (CONOVER; JOHNSON; JOHNSON, 1981).

O erro do tipo I consiste em rejeitar a hipótese nula quando a mesma é verdadeira, o erro do tipo II ocorre quando não é possível rejeitar a hipótese nula dado que de fato a H_0 é falso. O poder do teste estatístico é definido como sendo a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando a mesma é falsa, o que caracteriza uma situação de acerto (BOX, 1954).

A estatística de teste de Bartlett calcula a média aritmética ponderada e a média geométrica ponderada de cada variância da amostra com base nos graus de liberdade. Quanto maior a diferença nas médias, maior é a probabilidade de variâncias das amostras não serem iguais. Quando o valor de p é menor do que o de seu nível de α , rejeita-se a hipótese nula de que as variâncias são iguais (WADDA, 1985) (BARTLETT, 1937). O teste de Bartlett, é o mais adequado para comparação de variâncias pois possui maior precisão e alto poder para a probabilidade do erro tipo I (CONNOVER et al., 1981). O Quadro 8 apresenta os critérios de decisão para avaliação do teste de Bartlett.

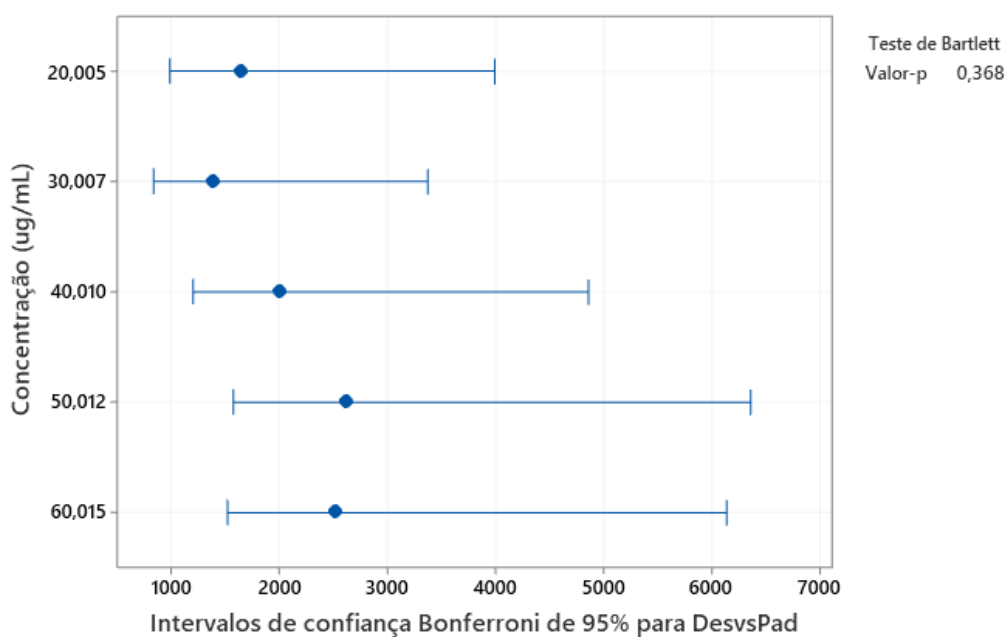
Quadro 8: Critérios de decisão para avaliação do teste de Bartlett.

Teste de Bartlett		
Hipóteses	Critério de decisão	Conclusão
H₀: as variâncias são iguais	$p\text{-valor} \leq 0,05 \Rightarrow$ rejeita-se a hipótese nula	Há diferença estatística significativa entre as variâncias – dados heterocedásticos.
H₁: as variâncias são diferentes	$p\text{-valor} > 0,05 \Rightarrow$ aceita-se a hipótese nula	Não há diferença estatística significativa entre as variâncias – dados homocedásticos.

Fonte: Adaptado, BARTLETT, 1937

O Minitab® apresenta uma estatística de teste e um valor de p para o teste de Bartlett. Esse teste é aplicado para análise de variâncias quando os dados possuem mais de dois níveis e são provenientes de distribuição normal, uma vez que o teste de Bartlett não é robusto para desvios da normalidade. A Figura 29 apresenta o resultado para o teste de Bartlett.

Figura 29: Teste de Bartlett para igualdade de variâncias.



Fonte: *software* Minitab®

Verifica-se pelo gráfico gerado que intervalos de comparações se sobrepõem, dessa forma, há um indicativo de que nenhuma das diferenças entre os grupos é estatisticamente significativa. De acordo com o valor-p obtido pelo teste estatístico de Bartlett, aceita-se a hipótese nula de que não há diferença estatística significativa entre as variâncias, portando, conclui-se que os dados são homocedásticos (BARTLETT, 1937).

4.2.7.4. Teste de Durbin-Watson

A verificação da existência de autocorrelação residual na análise de regressão para verificação da independência, e da autocorrelação serial entre observações em análises de séries temporais é de extrema importância para a validação da técnica analítica empregada (PIMENTEL, 1985).

Um dos pressupostos que o modelo de regressão precisa atender é a ausência de correlação entre os erros, isto é, os erros são independentes sob a condição de normalidade. A autocorrelação pode ser definida como correlações entre integrantes de séries de observações ordenadas no tempo (GUJARATI, 2006).

A estatística de Durbin-Watson envolve o cálculo de um teste baseado nos resíduos do método de regressão de mínimos quadrados. Durbin e Watson tabularam os limites inferiores, DL, e os limites superiores, DU, para vários valores de n (número de

dados) e k (número de variáveis explicativas), tais que, se o d calculado estiver fora desses valores críticos, é possível a verificação da autocorrelação (DURBIN; WATSON, 1950) (CARLO; TRYON, 1993).

A avaliação do teste se dá por meio da comparação do valor tabelado com o valor calculado, faz-se a conclusão do teste de acordo com as hipóteses apresentadas no Quadro 9.

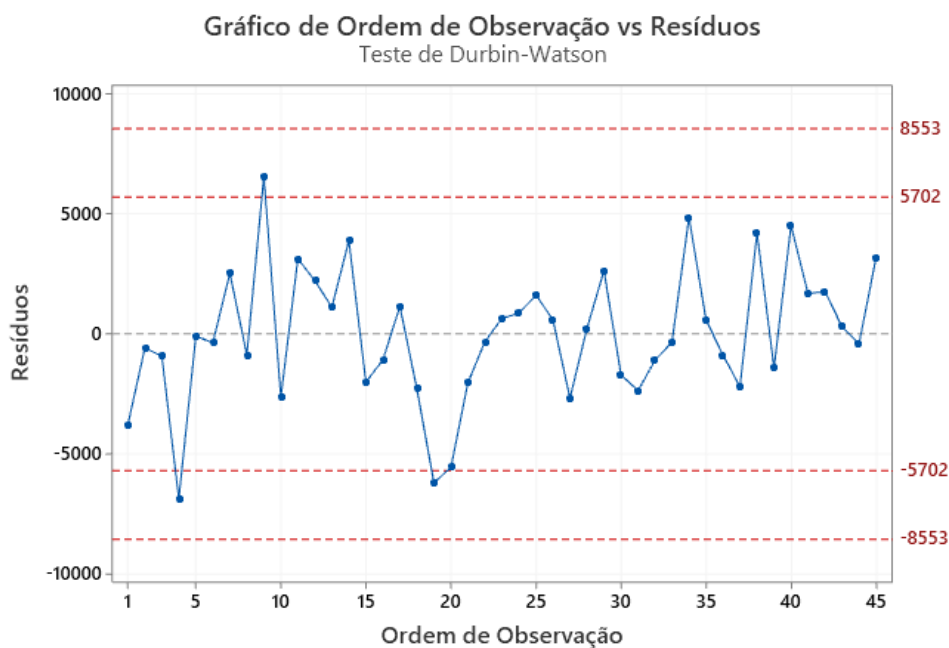
Quadro 9: Avaliação das hipóteses para teste de Durbin-Watson.

Teste de Durbin-Watson	
Hipóteses	Conclusão
Se $D > DU$	Não existe correlação.
Se $D < DL$	Existe uma correlação positiva.
Se D estiver entre os dois limites	O teste é inconclusivo.

Fonte: Adaptado, SAVIN; WHITE, 1977

A estatística Durbin-Watson (D) está condicionada à ordem das observações. O Minitab supõe que as observações estão em uma ordem significativa, como ordem de tempo. A estatística de Durbin-Watson determina se a correlação entre os termos de erro adjacente é zero. A Figura 30 apresenta o gráfico de ordem de observação versus resíduos.

Figura 30: Gráfico de ordem de observação versus resíduos.

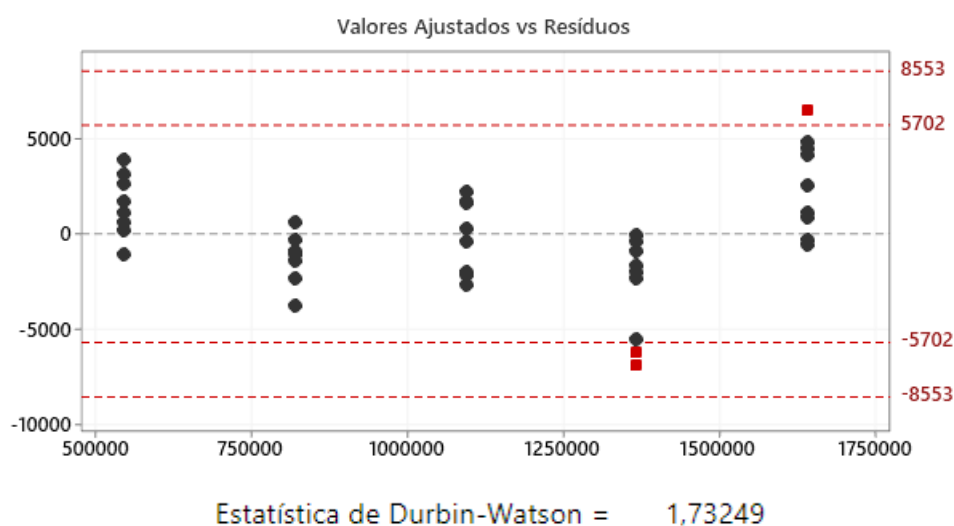


Fonte: *software* Minitab®

A partir da análise gráfica verifica-se a hipótese de independência dos resíduos, observa-se que não há uma tendência dos pontos, ou seja, os pontos não possuem um comportamento que se repete em determinado ponto do gráfico, o que indicaria dependência dos resíduos.

Utiliza-se a estatística Durbin-Watson para testar a presença de autocorrelação nos erros de um modelo de regressão. A autocorrelação significa que os erros de observações adjacentes são correlacionados. Se os erros estiverem correlacionados, a regressão de mínimos quadrados pode subestimar o erro padrão dos coeficientes. Os erros padrão subestimados podem fazer com que seus preditores pareçam significativos quando eles não são. A Figura 31 apresenta o gráfico de valores ajustados versus resíduos e o valor D obtido pelo teste.

Figura 31: Gráfico de valores ajustados versus resíduos e valor de D.



Fonte: *software* Minitab®

De acordo com os valores tabelados para a estatística de Durbin-Watson, dispostos no ANEXO 3, para um número de dados igual a 45 e número de variáveis explicativas igual a dois, tem-se o valor de DL de 1,43 e o valor de DU igual a 1,62. Uma vez que o calculado pelo Minitab® é de 1,73, pode-se concluir que D é maior que DL. Portanto, a premissa de ausência de correlação serial nos erros pressupõe que o erro relacionado a qualquer das observações não é influenciado pelo erro de qualquer outra observação.

Verifica-se que a um nível de significância de 5% os resíduos gerados pelo modelo têm comportamento puramente aleatório. A presença de correlação serial nos resíduos poderia indicar problemas de especificação, pois alguma característica da série

não foi captada pelo modelo, sugerindo a inclusão de mais defasagens da variável dependente, ou defasagens adicionais das variáveis exógenas, ou novas variáveis causais (SAVIN; WHITE, 1977).

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou a análise de diferentes metodologias para o doseamento de colecalciferol (vitamina D₃) na matéria-prima do medicamento farmacêutico. Verificou-se que as modificações de fase móvel e fase estacionária na metodologia melhoraram significativamente a resolução dos picos obtidos nos cromatogramas. Na fase composta por 99,4% de n-hexano, 0,5% de 1-pentanol e 0,1% de acetonitrila, empregou-se o hexano como solvente de base para ajustar a polaridade da fase móvel e o 1-pentanol comportou-se como melhor modificador da fase móvel frente ao clorofórmio, em razão de sua boa estabilidade nas condições utilizadas pela técnica.

O uso da acetonitrila como modificador mostrou-se benéfico, pois resultou em menor variação no tempo de retenção de uma corrida para outra e um aumento substancial na capacidade da coluna, devido ao aumento da linearidade das isotermas de adsorção. Além disso, foi capaz de reduzir a cauda de picos e a decomposição da amostra, tais benefícios são fruto da adsorção preferencial da acetonitrila pelos sítios ativos na superfície do adsorvente, conduzindo a uma nova superfície desse adsorvente.

Dessa forma, a metodologia desenvolvida foi capaz de isolar as possíveis impurezas farmacêuticas com a finalidade de quantificar os produtos de degradação. Visto isso, método desenvolvido por cromatografia em fase normal mostrou-se superior ao método por cromatografia em fase reversa, uma vez que o método por fase normal contempla os requisitos necessários para atender a RDC N° 166, de 24 de junho de 2017 e a RDC N° 53, de 4 de dezembro de 2015.

O modelo estatístico desenvolvido possibilitou a avaliação da linearidade do método para o procedimento da validação analítica por meio do *software* Minitab®. Verificou-se que o método é linear uma vez que as respostas analíticas são diretamente proporcionais à concentração do analito em toda a faixa de trabalho. Os testes de hipóteses aplicados por meio do método dos mínimos quadrados ordinários a nível de significância de 5%, comprovaram a linearidade do método.

Dado os requisitos da RDC N° 166, de 24 de junho de 2017, torna-se necessário a avaliação dos parâmetros de precisão, seletividade, exatidão e intervalo para validação completa do método.

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia no 10, de 30 de agosto de 2017. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. Disponível em: <https://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1Tratamento-estatistico-validacao-analitica.pdf>> Acesso em 01 outubro 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. Volume 1, 5ª edição, Brasília: Fundação Oswaldo Cruz. 2010. 510 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 40, de 13 de janeiro de 1998**. Regulamento que estabelece normas para Níveis de Dosagens Diárias de Vitaminas e Minerais em Medicamentos. Brasília, DF. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de janeiro de 1998. Disponível em:< http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1998/prt0040_13_01_1998.html> Acesso em: 24 de junho 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 166** de 24 de julho de 2017. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acesso em: 23 junho 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 24** de 14 de junho de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0024_14_06_2011.html> Acesso em: 24 junho 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 242, de 26 de julho de 2018**, que regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como 14 medicamentos específicos e altera a RDC nº 24 de 14/06/2011, a RDC nº 107 de 05/09/2016, a IN nº 11 de 29/09/2016 e RDC nº 71 de 22/12/2009. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380552/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-242-de-26-de-julho-de-2018-34380517 Acesso em: 13 setembro 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0031_11_08_2010.html> Acesso em 10 julho 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015**. Disponível em: <http://www.abifina.org.br/arquivos/legislacao/resolucao_rdc_n_53_de_4_de_dezembro_de_2015.pdf> Acesso em 10 julho 2020.

ALDRICH, John H. “**Correlations Genuine and Spurious in Pearson and Yule**”. Statistical Science, 1995. p. 364-376.

ANDERSON, D. R.; SWEENEY, D. J. & WILLIAMS, T. A. **Essentials of statistics for business and economics**. Thomson Learning, 2002.

ANDERSON, T.W. **An introduction to multivariate statistical analysis**. New York: John Wiley and Sons, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – IMETRO, **Guia para a expressão da incerteza de medição**. 1998.

BARRAL, BARROS e ARAÚJO - Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 7, núm. 3, setembro-dezembro, 2007, pp. 309-315 Universidade Federal da Paraíba Paraíba, Brasil. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63770319>> Acesso em: 24 junho 2020.

BARTLETT, M.S. **Properties of sufficiency and statistical tests**. Proceedings of the Royal Society of London, serie A, London, 1937. p. 268-282.

BARWICK, V. **Preparation of calibration curves a guide to best practice**. LGC, 2003. p. 1-27

BOX, G.E.P. **Non-normality and tests on variances**. Biometrika, London, p. 318-335, 1953.

BOX, G. E. P. **Effects of inequality of variance and Correlation Between Errors in the Two Way Classification**. Annals of Mathematical Statistics, 25, 1954. p. 484- 498.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira** 5ª. ed,volume 1: Métodos Gerais, 2010, p. 542.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**. 5ª edição. São Paulo: Saraiva, 2002. P. 272.

CALLEGARI SM. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASELLA, G.; BERGER, R. **Inferência Estatística**. Tradução da 2ª edição norte-americana. São Paulo: Centage Learning, 2010.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos, estratégias e validação**. Ed. UFSCar: São Carlos, 2001.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC**. Ed. Edgard BüLCHER.:São Paulo, 1998.

COCHRAN, W.G. **The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total**. Annals of Eugenics, London, 1947. p. 47-52.

BARTLETT, M. S. **Properties of sufficiency and statistical tests**. Proceedings of the Royal Statistical Society - Serie A, 1937. p. 268-282.

COCHRAN, W.G. & COX, G.M. **Experimental designs**. 2.ed. London, John Wiley, 1957. p. 611.

COCHRAN, W.G. **The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total**. Annals of Eugenics, London, 1947. p. 47-52.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COMBS, G. F. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. 3. Ed., San Diego: Academic Press, 2008. 618p.

CONOVER, W. J.; JOHNSON, M. E. e JOHNSON, M. M. **A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data**. *Technometrics*, 1981.p. 351-361.

DE CARLO, L. T.; TRYON, W. W. **Estimating and testing autocorrelation with small samples.**, Oxford, v.31, n.8, 1993. p.781-788.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia, um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, p. 21-25, 1998. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/actual.pdf>>. Acesso em: 23 junho 2020.

DESAI, N. D. et al. **Stability-Indicating LC Method for Assay of Cholecalciferol. Chromatographia**. 2009. p. 385–388.

DESVENDANDO OS MISTÉRIOS DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) - *Revista Política Hoje*, Vol. 18, n. 1, 2009. Disponível em: <http://bibliotecadigital.tse.jus.br/xmlui/bitstream/handle/bdtse/2766/2009_figueiredo_de_svendando_misterios_coeficiente.pdf?sequence=1> Acesso em 22 outubro 2020.

DRUGBANK: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Cholecalciferol. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00169>> Acesso em 23 junho 2020.

DURBIN, J.; WATSON G. S. **Testing for serial correlation in least squares regression**. *Biometrika*, London, v.37, 1950. p.409-428.

DURBIN-WATSON. Significance Tables. Disponível em:<https://www3.nd.edu/~wevans1/econ30331/Durbin_Watson_tables.pdf > Acesso em 01 outubro 2020.

EITENMILLER, R.; YE, L; LANDEN JR, W. O. **Vitamin analysis for the health and food sciences**. 2nd. ed. New York: CRC Press, 2008. p.83-118

ELLISON, S.L.R.; BARWICK, V.J.; FARRANT, T.J.D. **Practical Statistics for the Analytical Scientist**. RSC Publishing. A Bench Guide. 2ª Edição. 2009.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. VII ed. **Colecalciferol**. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2005. p.1303-1304

FIELD, A. **Descobrimo a estatística usando o SPSS**. São Paulo: Artmed, 2009.

MCBANE, G.C. "Programs to Compute Distribution Functions and Critical Values for Extreme Value Ratios for Outlier Detection," Journal of Statistical Software, Vol. 16, No. 3, 2006. p.1-9.

GARNÉS, S. J. A., SAMPAIO, R. J. B., DALMOLIN, Q., "Ajustamento paramétrico por mínimos quadrados", Congresso Brasileiro de Ciências Geodésicas, Curitiba – PR, 1997. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32981/D%20-%20SILVIO%20JACKS%20DOS%20ANJOS%20GARNES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 22 outubro 2020.

GONZÁLEZ, A. G., HERRADOR M. A., **A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles.** Trend in Analytical Chemistry, vol. 26, No 3, 2007. p. 227-237.

GONZALEZ, C. **Vitamin D Supplementation: An Update.** n. Figure 1, 2010. p. 1-6.

GROSS, J. nortest: Tests for Normality. 2012. Disponível em: <http://CRAN.Rproject.org/package=nortest> Acesso em 01 outubro 2020.

HARVEST OF PURE SCIENCE. Estrutura para coluna de sílica. Disponível em: http://www.materialharvest.com/welcome/silica_products/functional_and_reverse.html > Acesso em 23 junho 2020.

HAIG, Brian D. "Spurious correlation", in N. J. Salkind (ed.), Encyclopedia of Measurement and Statistics, Thousand Oaks, Sage, 2007.

HELENE, O. **Método dos Mínimos Quadrados com Formalismo Matricial**, LF Editorial, 2ª edição, 2013.

HOLICK, MF. **Resurrection of vitamin D deficiency and rickets.** J Clin Invest 2006. p. 62-72.

HOLICK, M. F. et al. **Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism, v. 96, n. 7, 2011. p. 11-30.

HPLC separation modes: Waters. Disponível em: https://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-SeparationModes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_us > Acesso em: 16 julho 2020.

ICH. Pharmaceutical Development. Q8(R2) - ICH Harmonised Tripartite Guideline. [S.l: s.n.] 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. DOQ–CGCRE–008: **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** INMETRO, 2011. 19p.

KOZAK, Marcin. (2009), "What is strong correlation?". Teaching Statistics, 31: 85-86

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida de alta eficiência.** Ed. Átomo; 2009.

LANÇAS, F. M.. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística aplicada**. São Paulo: Prentice Hall, 2007.

LEHNINGER A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6. Ed., São Paulo: Artmed, 2014, cap 7.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Ed. Átomo: Campinas, 2002.

MAGALHÃES, M. N. & LIMA, A. C. P. (2001), Noções de Probabilidade e Estatística, USP, São Paulo. Disponível em: <https://www.ime.usp.br/~noproest/pdf/noproest7reimp1_7reimp2rev.pdf> Acesso em 29 outubro 2020.

MANUAL MERCK DE INFORMAÇÃO MÉDICA. Saúde para a família. São Paulo: Merck Sharp & Dohme, 1995-2004. Seção 12: Distúrbios da nutrição e do metabolismo, Capítulo 135: Vitaminas e minerais.

MARTINS & SILVA, J. **Bioquímica fisiológica**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

M&M Instruments Inc. Estrutura para coluna amino (NH₂). Disponível em: <<https://www.technosaurus.co.jp/categories/view/638>> Acesso em 23 junho 2020.

MILLER, JC e MILLER, JN., **Statistics for Analytical Chemistry**, 3rd edition, Ellis Horwood. Prentice Hall, 1994.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - (MAPA), **Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica**. Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, Brasília, 2011.

MFELTS, M.L.R, SOBRINHO, J. L., NUNES, L. C. & ROLIM, P. J. N. **Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos**. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/pag_177a180.pdf> Acesso em: 13 setembro 2020.

Montgomery, D. C., **Design and Analysis of Experiments**, John Wiley and Sons. 1977.

MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES D. C. **Introduction to the theory of statistics**. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1974, 842p.

MOORE, D. S. & McCABE, George. **Introduction to the practice of statistics**. New York, Freeman, 2004.

MOORE, David S., **The Basic Practice of Statistics**. New York, Freeman, 2007.

NAGAI, V.; CONAGIN, A. & IGUE, T. **Sensibilidade de diferentes testes de homogeneidade das variâncias.** Revista de Agricultura, Piracicaba, 1991. p. 65-76.

NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J., & WASSERMAN, W. **Regressão simples - Visão geral.** 2016.

NOGUEIRA, D, P.; PEREIRA, G, M. **Desempenho de testes para homogeneidade de variâncias em delineamentos inteiramente casualizados.** Sigmae, Alfenas, v.2, n.1, 2003. p. 7-22.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 11.ed. São Paulo, Nobel, 1985. 466p.

ROYSTON, P. **An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples.** Applied Statistics, 31, 1982. p. 115-124.

SAVIN, N. E. e WHITE, K. J. (1977). **The Durbin-Watson test for serial correlation with extreme sample sizes or many regressors.** Econometrica, 45(8), p. 1989-1996.

SCHEFFÉ, H. **The Analysis of Variance**, primeira edição, John Wiley & Sons, New York. 1959.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S. R. – **Fundamentos de Química Analítica**, 1 a ed., Thomson, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental.** 8.ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.

SNYDER, L. R.J. **Chromatography.**, 1978. p. 92-223.

SNYDER, L.R., KIKERLAND, J.J.. **Introduction to modern liquid chromatography;** 2 ed.; Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1979.

Tabela Teste de Cochran. Disponível em:<
http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/tabelas/cochran_95_100.htm >
Acesso em 01 outubro 2020.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2007, v.1.

VAN DEEMTER, J.J., ZVIDERWEG, F. KLINKENBERG A. **Longitudinal diffusion and resistance to massa transfer as causes of non ideality in chromatography.** Chemical Engineering Science. 1956. p. 5-271

VIEIRA, S. (2006), **Análise de variância: ANOVA**, Atlas, São Paulo. Disponível em: < <http://lite.acad.univali.br/rcurso/anova/> > Acesso em 29 outubro 2020.

VOET, Donald.; VOET, Judith G, Pratt CW. **Fundamentos de bioquímica.** Artmed. 2008.

VUOLO J. H., **Fundamentos da teoria de erros**, 2º Ed., São Paulo, 1996. p. 152-153.

WADA, R.S. **A questão da heterocedasticidade na comparação de duas médias.** Piracicaba, 1985. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - ESALQ- -USP, 1985. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/brag/v52n2/10.pdf>> Acesso em 22 outubro 2020.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** 3. ed. Churchill Livingstone: London, 1999.

WADA, R.S. **A questão da heterocedasticidade na comparação de duas médias.** Piracicaba, 1985. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - ESALQ- -USP, 1985. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/brag/v52n2/10.pdf>> Acesso em 22 outubro 2020.



==== Relatório de Análise ====

<Summary Report>

HPLC N

Calibration Curve

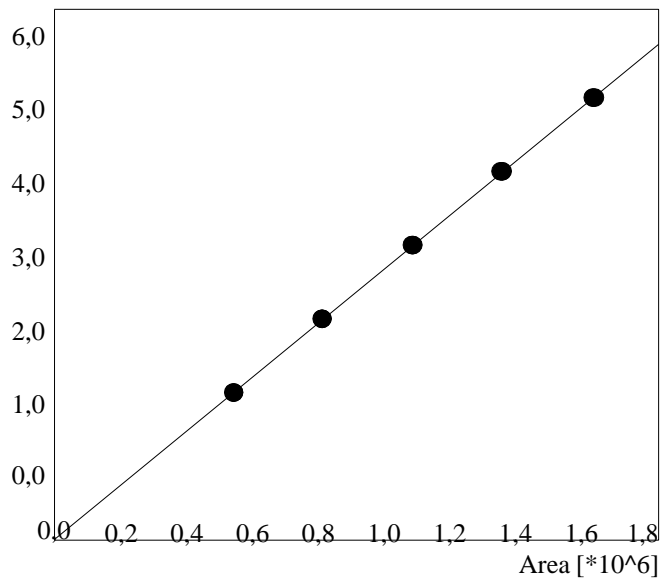
Name: Colecalciferol

Quantitative Method: External Standard Function : $f(x)=3,65037e-005*x+0,109660$

$R=0,9999658$ $R^2=0,9999316$

FitType : Linear Detector Name : PDA

Conc. [$*10^1$] 7,0



#	Conc.	Area
1	30,007	815087
2	60,015	1640534
3	30,007	817957
4	50,012	1360175
5	50,012	1366949
6	40,01	1092591
7	60,015	1643648
8	30,007	817998
9	60,015	1647670
10	40,01	1090326
11	20,005	547925
12	40,01	1095170
13	20,005	545901
14	20,005	548672
15	50,012	1365038



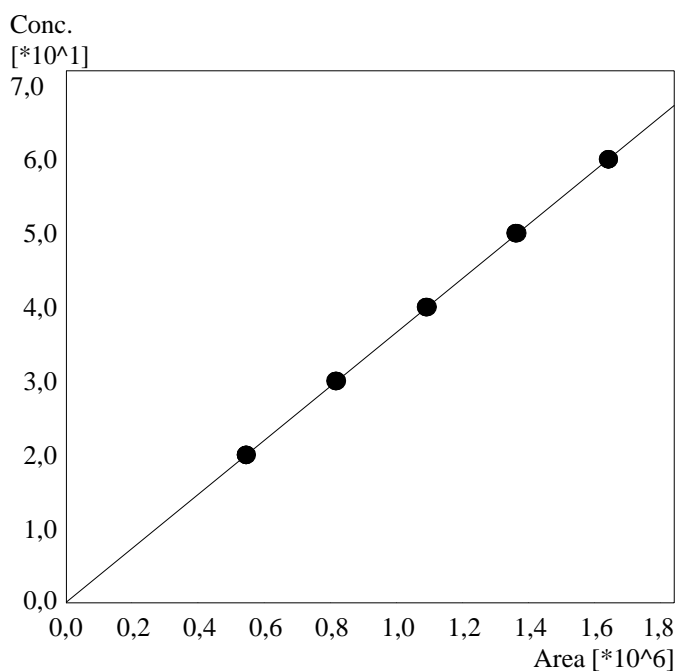
==== Relatório de Análise ====

<Summary Report>

HPLC N

Calibration Curve

Name : Colecalciferol
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3,65564e-005*x+0,0895727$
 $R=0,9999817$ $R^2 =0,9999635$
 FitType : Linear
 Detector Name : PDA



#	Conc.	Area
1	30,007	817793
2	60,015	1642272
3	30,007	816581
4	50,012	1360851
5	50,012	1361477
6	40,01	1090926
7	60,015	1640804
8	30,007	819525
9	60,015	1641980
10	40,01	1094577
11	20,005	545378
12	40,01	1090286
13	20,005	545022
14	20,005	547425
15	50,012	1365346

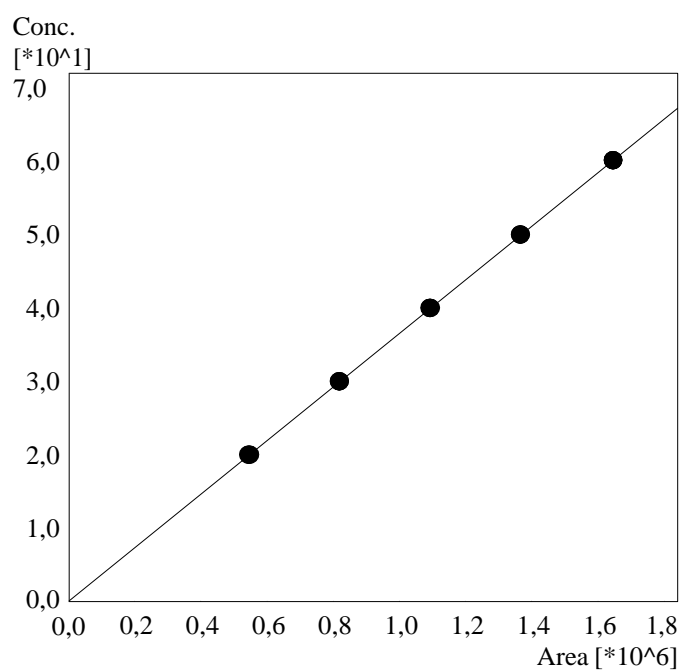
==== Relatório de Análise ====

<Summary Report>

HPLC N

Calibration Curve

Name : Colecalciferol
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3,65169e-005*x+0,0952956$
 $R=0,9999929$ $R^2=0,9999858$
 FitType : Linear
 Detector Name : PDA



#	Conc.	Area
1	50,012	1364677
2	20,005	543695
3	30,007	818538
4	60,15	1645975
5	30,007	819459
6	50,012	1366163
7	40,01	1090759
8	60,15	1645323
9	30,007	817457
10	60,15	1645627
11	40,01	1094643
12	20,005	546546
13	40,01	1093258
14	50,012	1366638
15	20,005	547969

====Shimadzu LabSolutions Method Report ====

<<Header>>

Generated : 11/09/2020 09:24:34
 GeneratedBy : Natani
 Modified : 28/09/2020 10:57:52
 ModifiedBy : Natani

<<System Controller>>

Model : CBM-20A
 Power On : On
 Event1 : Off
 Event2 : Off
 Event3 : Off
 Event4 : Off

<<Data Acquisition>>

LC Stop Time : 25,00 min
 PDA Detector Name : PDA
 PDA Sampling Frequency : 0,5 Hz
 PDA Start Time : 0,00 min
 PDA End Time : 25,00 min
 PDA Time Constant : 0,640 sec

<<Pump>>

Mode : Low pressure gradient
 Pump A : LC-20AT
 Total Flow : 2,000 mL/min
 B Conc. : 0,0 %
 C Conc. : 100,0 %
 D Conc. : 0,0 %
 B Curve : 0
 C Curve : 0
 D Curve : 0
 PressMax : 400 bar
 PressMin : 0 bar
 LPGE Mode : Auto

<<Autosampler>>

Autosampler Model : SIL-20A
 Enable Autosampler : Use
 Sample Rack : Rack 1,5 mL 105 vials
 Rinsing Volume : 500 uL
 Needle Stroke : 52 mm
 Control Vial Needle Stroke : 52 mm
 Rinsing Speed : 35 uL/sec
 Sampling Speed : 15 uL/sec
 Purge Time : 25,0 min
 Rinse Mode : Before/After
 Rinse Dip Time : 0 sec

<<Oven>>

Oven Model : CTO-10ASvp
 Enable Oven : Use
 Oven Temperature : 25 C
 Maximum Temperature : 40 C
 Ready Check : On

<<LC Time Program>>

Time	Module	Command	Value
25,00	Controller	Stop	

<<Auto Purge>>

<<PDA>>

PDA Model : SPD-M20A
 Lamp : D2&W
 Start Wavelength : 190 nm
 End Wavelength : 800 nm
 Use Cell Temp. : Use
 Cell Temp. : 40 C
 Slit Width : 1,2 nm
 Reference Correction : Not Used
 Ref. Wavelength : 350 nm
 Ref. Bandwidth : 20 nm
 Channel 1 Wavelength : 265 nm

Channel 1 Bandwidth : 1 nm
Channel 1 Output Range : 1,0 AU/V
Channel 1 Polarity : +
Channel 2 Wavelength : 250 nm
Channel 2 Bandwidth : 4 nm
Channel 2 Output Range : 1,0 AU/V
Channel 2 Polarity : +
Channel 3 Wavelength : 250 nm
Channel 3 Bandwidth : 4 nm
Channel 3 Output Range : 1,0 AU/V
Channel 3 Polarity : +
Channel 4 Wavelength : 250 nm
Channel 4 Bandwidth : 4 nm
Channel 4 Output Range : 1,0 AU/V
Channel 4 Polarity : +

<<Peak Integration>>

<PDA>

Channel : Extracted Chromatogram
Algorithm : Chromatopac
Width : 5 sec
Slope : 1000 uV/min
Drift : 0 uV/min
T.DBL : 1000 min
Min.Area/Height : 1000 counts
Calculated by : Area
Auto : Off
Register Spectrum to Table : Off
Max Slices : 0
Peak Top Detection : Normal
RT Compensation Mode : Fine
Tailing Off : Off
Min.Area/Height is made effective in Manual Integration : Off
Noise Calculation Settings : Noise Data : Current Data
Calculation Method : ASTM
Range : Whole Range
Interval : 0,5 min
Include the Peak Detected Range : Off
Detection Limit Coefficient : 3,3
Quantitative Limit Coefficient : 10,0
Drift Calculation Settings : 0,000 - 15,000 min
Channel : Ch1 265nm,1nm
Algorithm : i-PeakFinder
Detection Threshold : 5
Integration Range : 8 - 20 min
Baseline Type : Base to Base
(Filter)Min. Area : Not Used
(Filter)Min. Height : Not Used
(Filter)Min. Aspect : Not Used
Register Spectrum to Table : Off
Advanced(i-PeakFinder) :
Noise Estimation : Not Used
Integrate Off in Noise Estimation Range : Off
Minimum Half Width : Not Used
Maximum Half Width : Not Used
Peak Baseline Height : Not Used
Tailing Off : Off
Detection Threshold of Unseparated Small Peak : Not Used
Unify Peaks by Separation Width : Not Used
Unify Peaks by Depth Ratio : Not Used
Unify Peaks by Shoulder Ratio : Not Used
Shoulder Peak Detect Off : Off
Calculated by : Area
Max. Peaks : Not Used
Relative to Main Peak : Not Used
Algorithm Version : Ver.1.2
Noise Calculation Settings : Noise Data : Current Data
Calculation Method : ASTM
Range : Whole Range
Interval : 0,5 min
Include the Peak Detected Range : Off
Detection Limit Coefficient : 3,3
Quantitative Limit Coefficient : 10,0
Drift Calculation Settings : 0,000 - 15,000 min

<<Integration Time Program(Method)>>

<PDA>

Channel : Extracted Chromatogram
Time Program : None

Channel : Ch1 265nm,1nm
Time Program : None

<<Integration Time Program(Data)>>

<PDA>

Channel : Extracted Chromatogram
Time Program : None

Channel : Ch1 265nm,1nm
Time Program : None

<<Identification>>

<PDA>

Window/Band : Window
Window : 5,00 %
Identification Method : Relative
Peak Selection : Closest Peak(Relative)
Display not identified peaks : Not display
Retention Time Update : Average

<<Quantitative>>

<PDA>

Quantitative Method : External Standard
Calculated by : Area
of Calibration Levels : 15
Curve Fit Type : Linear
Zero : Not Forced
Weighting Method : None
X Axis of Calib. Curve : Area/Height
Units : mg/L
Format of Conc. : Decimals
Format of Conc. Figure : 5
Group Type : Conc. Summation
Check %Dev(Standard) : No
Check Accuracy[%](Standard) : No
Check %Dev(Control) : No
Check Accuracy[%](Control) : No
Check %Dev(Additive) : No
Check Accuracy[%](Additive) : No
Check %Dev(Unknown) : No
Check Accuracy[%](Unknown) : No
Check Quantitation Limit : No
Check Detect Limit : No

<<Compound Table>>

<PDA>

ID# : 1
Name : Colecalciferol
Type : Reference
Channel : Ch1 265nm,1nm
Retention Time : 16,333 min
RT Ratio : 1,000
Concentration : [1]=30,007 [2]=60,015 [3]=30,007
[4]=50,012 [5]=50,012 [6]=40,01
[7]=60,015 [8]=30,007 [9]=60,015
[10]=40,01 [11]=20,005 [12]=40,01
[13]=20,005 [14]=20,005 [15]=50,012
Peak Selection : Default(Closest Peak(Relative))
Standard Spectrum : None
Similarity : 0,9000
Wavelength : 190 - 800
Calculated by : Default(Area)
Curve Fit Type : Default(Linear)
Zero : Default(Not Forced)
Weight : Default(None)
Window/Band : Default(Window)
Spiked : 0,000
Group# : 0
1st Coefficient : 3,650373e-005
Intersection : 1,096598e-001
Correction Factor : 1,000000
Standard concentration factor : 1,000000

<<Group Table>>

<PDA>

<<Column Performance>>

<PDA>

Calculation Method : USP
Unretained Peak Time : Set Time 1,4119 min
Column Length : 250 mm
Calculate Identified Peaks Only : Off
Calculation of Relative Retention Time : On
Reference Peak : ID#
ID# (Reference) 1
Unretained Peak Time Correction : Not Used

<<Multi Chromatogram Table>>

Multi Chromatogram Table# :
Ch# 1 : 265 nm, 1nm (x1,00)
Multi Chrom Mode : Fine
Reference Correction : Not Used
Display Extracted Chromatogram : On
Extraction Settings : 4nm (x1,00)

<<UV Spectrum>>

Filtering Type : None
Interpolate Spectra : Off
Background Compensation : Off
Smoothing Points 0
Lambda min/max Wavelength From : 190 nm
Lambda min/max Wavelength To : 800 nm
Lambda min/max Decimals 0
Similarity Wavelength From : 190 nm
Similarity Wavelength To : 800 nm
Similarity Decimals 4

<<UV Library Search>>

Wavelength From : 190 nm
Wavelength To : 800 nm
Max # of Hits 1
Prefilter On : Off
Prefilter : Enable Index Parameter
Use Library in Folder : No
Use Library in Specified Folder : No

<<Purity>>

Noise Spectrum 1 Ret. Time From : 11 min
Noise Spectrum 1 Ret. Time To : 12 min
Compute Noise Spectrum from Current Data : On
Wavelength From : 200 nm
Wavelength To : 800 nm
Wavelength Step : 1 nm
Compensation Coefficient 0
Background Compensation : On
Compute Purity Option : All Peaks

ANEXO 3

Tabela de Durbin-Watson – Significância 95%

01/10/2020

Durbin-Watson Critical Values - 95% (d) – SPS TECHNICAL SERVICE

[SPS Home](#) > [Stats Tables](#) > Durbin Watson 0.05 Table

Critical Values for the Durbin-Watson Statistic (d)										
Level of Significance $\alpha = .05$										
n	k = 1		k = 2		k = 3		k = 4		k = 5	
	d _L	d _U	d _L	d _U	d _L	d _U	d _L	d _U	d _L	d _U
6	0.61	1.40								
7	0.70	1.36	0.47	1.90						
8	0.76	1.33	0.56	1.78	0.37	2.29				
9	0.82	1.32	0.63	1.70	0.46	2.13	0.30	2.59		
10	0.88	1.32	0.70	1.64	0.53	2.02	0.38	2.41	0.24	2.82
11	0.93	1.32	0.66	1.60	0.60	1.93	0.44	2.28	0.32	2.65
12	0.97	1.33	0.81	1.58	0.66	1.86	0.51	2.18	0.38	2.51
13	1.01	1.34	0.86	1.56	0.72	1.82	0.57	2.09	0.45	2.39
14	1.05	1.35	0.91	1.55	0.77	1.78	0.63	2.03	0.51	2.30
15	1.08	1.36	0.95	1.54	0.82	1.75	0.69	1.97	0.56	2.21
16	1.10	1.37	0.98	1.54	0.86	1.73	0.74	1.93	0.62	2.15
17	1.13	1.38	1.02	1.54	0.90	1.71	0.78	1.90	0.67	2.10
18	1.16	1.39	1.05	1.53	0.93	1.69	0.92	1.87	0.71	2.06
19	1.18	1.4	1.08	1.53	0.97	1.68	0.86	1.85	0.75	2.02
20	1.20	1.41	1.10	1.54	1.00	1.68	0.90	1.83	0.79	1.99
21	1.22	1.42	1.13	1.54	1.03	1.67	0.93	1.81	0.83	1.96
22	1.24	1.43	1.15	1.54	1.05	1.66	0.96	1.80	0.96	1.94
23	1.26	1.44	1.17	1.54	1.08	1.66	0.99	1.79	0.90	1.92
24	1.27	1.45	1.19	1.55	1.10	1.66	1.01	1.78	0.93	1.90
25	1.29	1.45	1.21	1.55	1.12	1.66	1.04	1.77	0.95	1.89
26	1.30	1.46	1.22	1.55	1.14	1.65	1.06	1.76	0.98	1.88
27	1.32	1.47	1.24	1.56	1.16	1.65	1.08	1.76	1.01	1.86
28	1.33	1.48	1.26	1.56	1.18	1.65	1.10	1.75	1.03	1.85
29	1.34	1.48	1.27	1.56	1.20	1.65	1.12	1.74	1.05	1.84
30	1.35	1.49	1.28	1.57	1.21	1.65	1.14	1.74	1.07	1.83
31	1.36	1.50	1.30	1.57	1.23	1.65	1.16	1.74	1.09	1.83
32	1.37	1.50	1.31	1.57	1.24	1.65	1.18	1.73	1.11	1.82
33	1.38	1.51	1.32	1.58	1.26	1.65	1.19	1.73	1.13	1.81
34	1.39	1.51	1.33	1.58	1.27	1.65	1.21	1.73	1.15	1.81

35	1.40	1.52	1.34	1.58	1.28	1.65	1.22	1.73	1.16	1.80
36	1.41	1.52	1.35	1.59	1.29	1.65	1.24	1.73	1.18	1.80
37	1.42	1.53	1.36	1.59	1.31	1.66	1.25	1.72	1.19	1.80
38	1.43	1.54	1.37	1.59	1.32	1.66	1.26	1.72	1.21	1.79
39	1.43	1.54	1.38	1.60	1.33	1.66	1.27	1.72	1.22	1.79
40	1.44	1.54	1.39	1.60	1.34	1.66	1.29	1.72	1.23	1.79
45	1.48	1.57	1.43	1.62	1.38	1.67	1.34	1.72	1.29	1.78
50	1.50	1.59	1.46	1.63	1.42	1.67	1.38	1.72	1.34	1.77
55	1.53	1.60	1.49	1.64	1.45	1.68	1.41	1.72	1.38	1.77
60	1.55	1.62	1.51	1.65	1.48	1.69	1.44	1.73	1.41	1.77
65	1.57	1.63	1.54	1.66	1.50	1.70	1.47	1.73	1.44	1.77
70	1.58	1.64	1.55	1.67	1.52	1.70	1.49	1.74	1.46	1.77
75	1.60	1.65	1.57	1.68	1.54	1.71	1.51	1.74	1.49	1.77
80	1.61	1.66	1.59	1.69	1.56	1.72	1.53	1.74	1.51	1.77
85	1.62	1.67	1.60	1.70	1.57	1.72	1.55	1.75	1.52	1.77
90	1.63	1.68	1.61	1.70	1.59	1.73	1.57	1.75	1.54	1.78
95	1.64	1.69	1.62	1.71	1.60	1.73	1.58	1.75	1.56	1.78
100	1.65	1.69	1.63	1.72	1.61	1.74	1.59	1.76	1.57	1.78
150	1.72	1.75	1.71	1.76	1.69	1.77	1.68	1.79	1.66	1.80
200	1.76	1.78	1.75	1.79	1.74	1.80	1.73	1.81	1.72	1.82
Where n = number of observations and k = number of independent variables										

Critical Values for the Durbin-Watson Statistic (d)										
Level of Significance $\alpha = .05$										
n	$k = 6$		$k = 7$		$k = 8$		$k = 9$		$k = 10$	
	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U
11	0.20	3.01								
12	0.27	2.83	0.17	3.15						
13	0.33	2.70	0.23	2.99	0.15	3.27				
14	0.39	2.57	0.29	2.85	0.20	3.11	0.13	3.36		
15	0.45	2.47	0.34	2.73	0.25	2.98	0.18	3.22	0.11	3.44
16	0.50	2.39	0.40	2.62	0.30	2.86	0.22	3.09	0.16	3.30
17	0.55	2.32	0.45	2.54	0.36	2.76	0.27	2.98	0.20	3.18
18	0.60	2.26	0.50	2.47	0.41	2.67	0.32	2.87	0.24	3.07

19	0.65	2.21	0.55	2.40	0.46	2.59	0.37	2.78	0.29	2.97
20	0.69	2.16	0.60	2.34	0.50	2.52	0.42	2.70	0.34	2.89
21	0.73	2.12	0.64	2.30	0.55	2.46	0.46	2.63	0.38	2.81
22	0.77	2.09	0.68	2.25	0.59	2.41	0.51	2.57	0.42	2.73
23	0.80	2.06	0.72	2.21	0.63	2.36	0.55	2.51	0.47	2.67
24	0.84	2.04	0.75	2.17	0.67	2.32	0.58	2.46	0.51	2.61
25	0.87	2.01	0.78	2.14	0.70	2.28	0.62	2.42	0.54	2.56
26	0.90	1.99	0.82	2.12	0.74	2.24	0.66	2.38	0.58	2.51
27	0.93	1.97	0.85	2.09	0.77	2.22	0.69	2.34	0.62	2.47
28	0.95	1.96	0.87	2.07	0.80	2.19	0.72	2.31	0.65	2.43
29	0.98	1.94	0.90	2.05	0.83	2.16	0.75	2.28	0.68	2.40
30	1.00	1.93	0.93	2.03	0.85	2.14	0.78	2.25	0.71	2.36
31	1.02	1.92	0.95	2.02	0.88	2.12	0.81	2.23	0.74	2.33
32	1.04	1.91	0.97	2.00	0.90	2.10	0.84	2.20	0.77	2.31
33	1.06	1.90	0.99	1.99	0.93	2.09	0.86	2.18	0.80	2.28
34	1.08	1.89	1.02	1.98	0.95	2.07	0.89	2.16	0.82	2.26
35	1.10	1.88	1.03	1.97	0.97	2.05	0.91	2.14	0.85	2.24
36	1.11	1.88	1.05	1.96	0.99	2.04	0.93	2.13	0.87	2.22
37	1.13	1.87	1.07	1.95	1.01	2.03	0.95	2.11	0.89	2.20
38	1.50	1.86	1.09	1.94	1.03	2.02	0.97	2.10	0.91	2.18
39	1.16	1.86	1.10	1.93	1.05	2.01	0.99	2.09	0.93	2.16
40	1.18	1.85	1.12	1.92	1.06	2.00	1.01	2.07	0.95	2.15
45	1.24	1.84	1.19	1.90	1.14	1.96	1.09	2.02	1.04	2.09
50	1.29	1.82	1.25	1.88	1.20	1.93	1.16	1.99	1.11	2.04
55	1.33	1.81	1.29	1.86	1.25	1.91	1.21	1.96	1.17	2.01
60	1.37	1.81	1.34	1.85	1.30	1.89	1.26	1.94	1.22	1.98
65	1.40	1.81	1.37	1.84	1.34	1.88	1.30	1.92	1.27	1.96
70	1.43	1.80	1.40	1.84	1.37	1.87	1.34	1.91	1.31	1.95
75	1.46	1.80	1.43	1.83	1.40	1.87	1.37	1.90	1.34	1.94
80	1.48	1.80	1.45	1.83	1.43	1.86	1.40	1.89	1.37	1.93
85	1.50	1.80	1.47	1.83	1.49	1.86	1.42	1.89	1.40	1.92
90	1.52	1.80	1.49	1.83	1.47	1.85	1.45	1.88	1.42	1.91
95	1.54	1.80	1.51	1.83	1.49	1.85	1.46	1.88	1.44	1.90
100	1.55	1.80	1.53	1.83	1.50	1.85	1.48	1.87	1.46	1.90
150	1.65	1.82	1.64	1.83	1.62	1.85	1.60	1.86	1.59	1.88
200	1.71	1.83	1.70	1.84	1.69	1.85	1.68	1.86	1.67	1.87
Where n = number of observations and k = number of independent variables										

ANEXO 4

Tabela Valores Críticos para o Teste de Cochran - 95% de Probabilidade.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093
5	0,8412	0,6838	0,5981	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4184	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3259	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1286	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0623	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120

Fonte: http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/tabelas/cochran_95_100.htm

ANEXO 5

Tabela F para $p = 0,05$, segundo o número de graus de liberdade (v1 e v2).

Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.

GL	V1																			
V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7	245.4	245.9	248.0	251.1	252.2	253.3	253.8
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.446	19.471	19.479	19.487	19.492
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.680	8.594	8.572	8.549	8.538
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803	5.717	5.688	5.658	5.643
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558	4.464	4.431	4.398	4.382
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874	3.774	3.740	3.705	3.687
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445	3.340	3.304	3.267	3.249
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150	3.043	3.005	2.967	2.947
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936	2.826	2.787	2.748	2.727
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774	2.661	2.621	2.580	2.559
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646	2.531	2.490	2.448	2.426
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.754	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544	2.426	2.384	2.341	2.319
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459	2.339	2.297	2.252	2.230
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388	2.266	2.223	2.178	2.155
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328	2.204	2.160	2.114	2.090
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276	2.151	2.106	2.059	2.035
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230	2.104	2.058	2.011	1.986
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191	2.063	2.017	1.968	1.943
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155	2.026	1.980	1.930	1.905
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124	1.994	1.946	1.896	1.870
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.096	1.965	1.916	1.866	1.839
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.071	1.938	1.889	1.838	1.811
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.048	1.914	1.865	1.813	1.785
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.027	1.892	1.842	1.790	1.762
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.007	1.872	1.822	1.768	1.740
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	1.990	1.853	1.803	1.749	1.720
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	1.974	1.836	1.785	1.731	1.702
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	1.959	1.820	1.769	1.714	1.685
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	1.945	1.806	1.754	1.698	1.669
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.932	1.792	1.740	1.683	1.654
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.839	1.693	1.637	1.577	1.544
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.784	1.634	1.576	1.511	1.476
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.748	1.594	1.534	1.467	1.430
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.703	1.545	1.482	1.411	1.370
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.676	1.515	1.450	1.376	1.333
120	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290	2.175	2.087	2.016	1.959	1.910	1.869	1.834	1.803	1.775	1.750	1.659	1.495	1.429	1.352	1.307
240	3.881	3.033	2.642	2.409	2.252	2.136	2.048	1.977	1.919	1.870	1.829	1.793	1.761	1.733	1.708	1.614	1.445	1.375	1.290	1.237

Fonte: <https://docs.ufpr.br/~niveam/ce071/An%C3%A1lise%20de%20Vari%C3%A2ncia.pdf>