

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

ANA CAROLINA RIBEIRO MENEZES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE EXCIPIENTE LACTOSE EM DIFERENTES
GRANULOMETRIAS E DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE FRUTOSE, GLICOSE E
SACAROSE**

**BELO HORIZONTE
2025**

ANA CAROLINA RIBEIRO MENEZES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE EXCIPIENTE LACTOSE EM DIFERENTES
GRANULOMETRIAS E DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE FRUTOSE, GLICOSE E
SACAROSE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Departamento de Química do CEFET-MG
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química Tecnológica
Orientador: Professor Dr. Patterson Patrício de
Souza
Co-orientador: Me. Tiago Aparecido da Silva

BELO HORIZONTE
2025

ANA CAROLINA RIBEIRO MENEZES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE EXCIPIENTE LACTOSE EM DIFERENTES
GRANULOMETRIAS E DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE FRUTOSE, GLICOSE E
SACAROSE

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

Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2025

Professor Doutor Patterson Patrício de Souza
(Orientador – CEFET-MG)

Mestre Tiago Aparecido da Silva
(Co-orientador – Fundação Ezequiel Dias - FUNED)

Doutora Janice Cardoso Pereira Rocha – CEFET-MG

Doutor Ildefonso Binatti – CEFET-MG

RESUMO

A lactose é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como excipiente devido à sua aplicabilidade como diluente e aglutinante. Além disso, possui bom desempenho físico e estabilidade química, características importantes na formulação de medicamentos. Contudo, a Farmacopeia Brasileira não possui monografia específica que determine como devem ser realizadas as análises na matéria-prima. Outras farmacopeias reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como as Farmacopeias Argentina e Estadunidense, utilizam dois métodos para a identificação do excipiente: espectroscopia no infravermelho e cromatografia em camada delgada (CCD). Apesar da simplicidade e baixo custo, a CCD apresenta limitações, como suscetibilidade a erros e baixa capacidade de automação. Portanto, este trabalho propõe o desenvolvimento e validação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de índice de refração (RID) ou UV/Vis para a detecção de frutose, glicose, sacarose e identificação de lactose em diferentes granulometrias. Quando comparado ao RID, o detector UV/Vis tem maior sensibilidade. Entretanto, a utilização de detectores UV/Vis pode ser desafiadora, já que, os analitos só são capazes de absorver a radiação em comprimentos de onda na região do UV distante, ou seja, comprimentos inferiores a 200 nm. Logo, o comprimento determinado para o desenvolvimento do método foi 190 nm, sendo o menor possível dentro do espectro UV-Vis. Após a definição das condições do método, foi realizada a validação analítica conforme critérios estabelecidos pela RDC nº 166/2017 da ANVISA e pelo DOQ-CGCRE-008/2020 do INMETRO, utilizando os parâmetros seletividade e limite de detecção. Na seletividade, observou-se que a presença de frutose, sacarose e glicose não interferem na identificação da lactose monoidratada. Dado que, os compostos possuem tempos de retenção distintos e com desvios padrões relativos abaixo de 2%. Através de métodos estatísticos, especificamente os testes de Gubbs, Shapiro-Wilk e Durbin-Watson, verificou-se a presença de *outliers*, a normalidade e aleatoriedade dos dados, respectivamente. Já os testes F e T, indicaram que, com 95% de confiança, as variâncias e médias das áreas da lactose monoidratada são estatisticamente equivalentes. As comparações foram feitas fixando o padrão de lactose monoidratada em contraste com os resultados obtidos para os padrões contendo os quatro compostos e nas amostras contendo a lactose monoidratada em diferentes granulometrias, frutose, glicose e sacarose. As amostras de duas granulometrias avaliadas foram lactose monoidratada

atomizada *Spray Dried* e lactose monoidratada 200 *mesh*. Para o limite de detecção avaliou-se 5 diferentes concentrações, o nível mais seguro e, conseqüentemente, o limite de detecção determinado foi de 0,6 mg mL⁻¹ de lactose monoidratada, 0,16 mg mL⁻¹ de frutose, 0,4 mg mL⁻¹ de sacarose e 0,4 mg mL⁻¹ de glicose. Nessa avaliação também foi verificado que a concentração 1,5 mg mL⁻¹ da lactose monoidratada não interfere na detecção dos outros compostos. Portanto, o método se demonstrou apto ao uso pretendido. De forma complementar, seria interessante avaliar sua robustez, considerando pequenas variações em parâmetros como comprimento de onda, temperatura da coluna, proporção da fase móvel, como forma de determinar quais são os parâmetros cruciais no desempenho do método.

Palavras-chave: Lactose; Excipientes farmacêuticos; Cromatografia líquida; Identificação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da molécula de lactose.....	6
Figura 2 - Cuba cromatográfica para identificação de lactose	10
Figura 3 - Diagrama de componentes HPLC.....	12
Figura 4 - Gráfico de densidade de probabilidade associado à distribuição normal	22
Figura 5 - Variações de distribuições normais	23
Figura 6 – Cromatograma obtido no RID.....	34
Figura 7 – Cromatograma gerado pelo DAD no método isocrático.....	35
Figura 8 – Método em gradiente	36
Figura 9 – Cromatograma da solução combinada	37
Figura 10 – Cromatograma da lactose.....	37
Figura 11 – Estruturas da frutose, glicose, sacarose e lactose. Estruturas feitas no software ChemSketch®.....	39
Figura 12 – Cromatograma do padrão de lactose monoidratada	42
Figura 13 – Cromatograma do padrão combinado	43
Figura 14 – Cromatograma grupo 1 para determinação do limite de detecção	46
Figura 15 - Cromatograma grupo 2 para determinação do limite de detecção.....	47
Figura 16 – Cromatograma grupo 3 para determinação do limite de detecção	47
Figura 17 – Cromatograma grupo 4 para determinação do limite de detecção	48
Figura 18 – Cromatograma grupo 5 para determinação do limite de detecção.....	48
Figura 19 - Comparação dos cromatogramas do grupo 4.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas da lactose	7
Quadro 2 - Definição de parâmetros de validação analítica.....	16
Quadro 3 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica	17
Quadro 4 - Soluções utilizadas na seletividade	29
Quadro 5 – Testes de hipóteses aplicados na seletividade	30
Quadro 6 – Soluções para teste de limite de detecção.....	31
Quadro 7 – Condições finais do método	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Preparo de soluções estoque	29
Tabela 2 – Soluções finais para seletividade	29
Tabela 3 – Preparo de soluções para limite de detecção	32
Tabela 4 – Preparo de soluções para limite de detecção	32
Tabela 5 – Dados experimentais sistematizados	40
Tabela 6 – Valores P para testes de Shapiro-Wilk e Durbin-Watson.....	42
Tabela 7 – Tempos de retenção e desvios padrão relativos para cada composto.....	44
Tabela 8 – Tabela de Desvio Padrão Relativo para amostras.....	44
Tabela 9 – Comparação de variâncias e médias entre áreas de lactose monoidratada...	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Lactose.....	5
3.2. Introdução a cromatografia.....	7
3.3. Identificação de lactose por cromatografia em camada delgada	8
3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	11
3.5. Métodos de análise de lactose e outros açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência	15
3.6. Validação de método analítico	16
3.6.1. Seletividade	17
3.6.2. Limite de Detecção	18
3.7. Análises Estatísticas	19
3.7.1. Teste de hipóteses	20
3.7.2. Análise de <i>Outliers</i>	21
3.7.3. Normalidade.....	22
3.7.4. Aleatoriedade	24
3.7.5. Análise de Variância	24
3.7.6. Análise de Médias.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Reagentes.....	27
4.2. Equipamentos	27
4.3. Condições cromatográficas.....	27
4.4. Validação analítica	28
4.4.1. Análises estatísticas e critérios de aceitação	28
4.4.2. Seletividade.....	29
4.4.3. Limite de Detecção	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Desenvolvimento do método	33
5.2. Validação analítica	38
5.2.1. Seletividade.....	38
5.2.2. Limite de Detecção	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A lactose possui fórmula química $C_{12}H_{22}O_{11}$, é composta por partículas brancas e cristalinas, possui sabor levemente adocicado e é inodora. Na indústria farmacêutica tem papel fundamental como excipiente. Isto porque, pode ser aplicado como diluente para aumentar a densidade bruta de produtos, e como aglutinante com intuito de melhorar a interação entre as partículas [1, 2].

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a autoridade reguladora responsável pela aprovação e fiscalização dos medicamentos. As farmacopeias são compêndios que estabelecem padrões e especificações para a qualidade de medicamentos e outros produtos de interesse da saúde pública. A ANVISA reconhece a Farmacopeia Brasileira como compêndio oficial e a define como principal referência para a qualidade de medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos no país [3].

Entretanto, a Farmacopeia Brasileira não possui monografia específica que aborde a lactose. Outros compêndios reconhecidos pela ANVISA, através da RDC nº 511 de 2021, adotam os testes espectroscopia na região do infravermelho e cromatografia em camada delgada (CCD) para averiguar a identidade da lactose utilizada como matéria-prima [4, 5, 6].

A CCD se destaca por ser um método cromatográfico de baixo custo que permite a separação de pequenas quantidades de amostra. Porém, o método não é automatizado, requerendo maior mão de obra e aumenta o tempo de análise e a suscetibilidade a erros. Outra limitação está associada a dificuldade de visualização de todas as manchas correspondentes aos padrões de referência, o que invalida o teste e gera retrabalho. Esse fenômeno ocorre devido a variável e lenta velocidade de migração da fase móvel, que pode gerar alargamento ou sobreposições de manchas [7]. Além disso, a ANVISA por intermédio da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 658/2022, que dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos, estabelece a necessidade de procedimentos adequados que assegurem a identidade da matéria-prima contida em cada recipiente [8]. Isso implica que os testes de identificação devem ser realizados volume a volume, gerando uma alta demanda. Esse fato torna o método por CCD desafiador, já que as placas cromatográficas possuem limite amostras que podem ser aplicadas. Portanto, pode-se inferir que a aplicação da CCD possui algumas limitações.

Já a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-performance liquid chromatography*) é uma técnica que se destaca por sua versatilidade e precisão. É amplamente utilizada para a separação de compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos. Além de se tratar de uma técnica automatizada, com amostradores automáticos, sistemas de análise de dados autônomos e geração de relatórios [9, 10].

Os detectores por índice de refração (RID, do inglês *Refractive Index Detector*) e os espectroscópicos como UV/Vis são muito utilizados em HPLCs. Esses últimos realizam o monitoramento dos compostos eluídos através de suas absorções de ondas eletromagnéticas na faixa do espectro UV-Visível (190 a 800 nm). E os RIDs realizam a detecção por meio da medida constante do índice de refração do eluato [9, 10].

Ambos detectores possuem suas particularidades e limitações. Em alguns casos, é necessário a detecção de substâncias em baixas concentrações. Isso pode ser um impedimento para a utilização do RID, que possui sensibilidade limitada. Em outros casos, os compostos absorvem a radiação na região do UV distante, em comprimentos de onda inferiores a 200 nm, limitando aplicação dos detectores desse tipo. Essa limitação ocorre, pois, muitos solventes também são capazes de absorver a radiação nesses comprimentos de onda [9, 11].

A Fundação Ezequiel Dias (Funed), fundada em 1907, produz dois medicamentos com lactose monoidratada em sua formulação, a Talidomida 100mg e o Entecavir monoidratado 0,5 mg. A Talidomida utiliza a lactose monoidratada *Spray Dried* como excipiente. Esse medicamento é fundamental no tratamento de hanseníase e outras doenças como mieloma múltiplo, lúpus, anemia e úlceras aftoides, sendo a Funed a única produtora dele no Brasil. Já o Entecavir monoidratado 0,5 mg utiliza a lactose monoidratada 200 *mesh*, sendo essencial no tratamento infecções crônicas no fígado ocasionadas pelo vírus da hepatite B. Visto a importância desses produtos, ressalta-se aqui o papel fundamental da Funed, uma vez que, seus produtos são destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS) [12, 13, 14, 14, 15].

No Serviço de Controle de Qualidade (SCFQ) da Funed a identificação das matérias-primas lactose é realizada por espectroscopia na região do Infravermelho e CCD. E, devido as dificuldades atreladas a utilização desse método. Este trabalho visa desenvolver um método de identificação de lactose por HPLC, utilizando o detector UV/Vis ou RID. Após o desenvolvimento do método, será feita a validação analítica. Que consiste em demonstrar, de forma experimental e sistemática que um método

atende aos requisitos específicos para o seu uso, garantindo a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos [16, 17].

A validação analítica será realizada conforme critérios e orientações presentes na RDC nº 166/2017, da ANVISA, e no DOQ-CGCRE-008/2020, do INMETRO. E os parâmetros analisados serão seletividade e limite de detecção.

Espera-se, como resultado, obter um método adequado ao uso e que ofereça uma alternativa à identificação de lactose por CCD. E assim, contribuir para a rotina de trabalho nos laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, em especial no Laboratório do Serviço de Controle de Qualidade (SCFQ) da Funed, onde este estudo foi conduzido.

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento e validação qualitativa de método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando detector de índice de refração (RID) ou UV/Vis para detecção simultânea de frutose, glicose e sacarose e identificação de lactose monoidratada utilizada como excipiente farmacêutico em duas diferentes granulometrias, lactose monoidratada atomizada *Spray Dried* e lactose monoidratada 200 *mesh*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

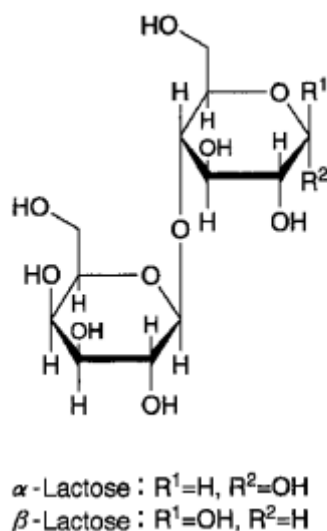
Este tópico apresenta o embasamento teórico que fundamenta a temática estudada. O percurso inicia-se com uma análise sobre a lactose (3.1), abordando suas características e propriedades físico-químicas, seu uso na indústria farmacêutica, suas formas de produção e os testes de identificação realizados na matéria-prima. Em seguida, no tópico sobre introdução à cromatografia (3.2), são discutidos os princípios da técnica e suas características. Esse tópico fornece a base para as técnicas subsequentes de identificação da lactose por cromatografia em camada delgada (3.3) e cromatografia líquida de alta eficiência (3.4). No tópico seguinte, realiza-se um levantamento sobre os métodos de análise da lactose e outros açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (3.5), visando fornecer suporte teórico para o desenvolvimento do método de identificação da lactose. O tópico de validação de método analítico (3.6) tem como objetivo avaliar o percurso e os parâmetros necessários para a validação da metodologia proposta para a identificação da lactose. Por fim, as análises estatísticas (3.7) são abordadas para tratamento de dados e avaliação dos parâmetros de validação.

3.1. Lactose

A lactose possui fórmula química $C_{12}H_{22}O_{11}$, é classificada como um dissacarídeo natural, pertencente ao grupo dos açúcares. Na indústria farmacêutica tem papel fundamental como excipiente, principalmente na produção de comprimidos. A importância da lactose para a indústria farmacêutica está atrelada ao seu alto desempenho físico e estabilidade química, boa relação custo-benefício, além de seu potencial aglutinante e diluente, características essenciais para a produção de comprimidos e cápsulas [1, 2, 18].

A substância é formada pela união de dois monossacarídeos, galactose e glicose, ligados por uma ligação β -1,4-glicosídica. Em termos de estrutura tridimensional, a lactose apresenta dois isômeros, que diferem na posição relativa do grupo hidroxila (-OH) e do hidrogênio (-H) no C-1 no anel da glicose. Essa diferença estrutural origina os isômeros α -lactose e β -lactose, que podem ser distinguidos por suas rotações específicas de luz polarizada. Essas configurações estruturais estão representadas na Figura 1 [1, 19, 20, 18].

Figura 1 – Estrutura da molécula de lactose



Fonte: Japanese Pharmacopoeia, 2021, p.1018.

Quando a lactose está em solução aquosa, ocorre um fenômeno denominado mutarrotação. Esse processo ocorre devido a capacidade das formas α e β -lactose de se converterem uma na outra, até que se estabeleça um equilíbrio no qual os isômeros coexistem. Assim como a temperatura influencia significativamente a solubilidade da lactose, também existe uma relação de dependência entre a temperatura e o equilíbrio das formas α e β -lactose. Com o aumento da temperatura da solução, a solubilidade da α -lactose aumenta, deslocando o equilíbrio em direção à formação da β -lactose. E, quando a temperatura atinge 93,5 °C, o isômero β é predominante [21].

A forma mais comum de comercialização da substância é na forma de α -lactose monoidratada, formas anidras da lactose também estão disponíveis, porém, apresentam alto grau de higroscopicidade, comprometendo sua utilização na indústria farmacêutica. A β -lactose é comumente encontrada em formulações contendo 70% de β -lactose e 30% α -lactose, mas podem ser encontradas em outras proporções [1, 22].

A α -lactose monoidratada é obtida por processo de cristalização em soluções supersaturadas em temperaturas inferiores a 93,5 °C. Já a β -lactose anidra é obtida pelo mesmo processo, mas, em temperaturas superiores a 93,5 °C. Outros métodos de produção de α -lactose monoidratada podem ser empregados para otimizar as características de compressibilidade da lactose, gerando produtos com diferentes morfologias e granulometrias [1].

A α -lactose monoidratada cristalina foi, por muitos anos, a única opção disponível no mercado. O que não era ideal, já que não possibilitava a produção de medicamentos

por compressão direta, devido às características de baixa fluidez e escoamento. Em 1960, foi inserido no mercado um novo tipo de lactose, denominada lactose seca por aspersão, ou lactose “*spray dried*”. Sua produção é feita através da secagem por aspersão de uma suspensão aquosa saturada de α -lactose e β -lactose, na proporção de 60 e 40%, respectivamente. Após a secagem e tamisação, o produto resultante contém de 9 a 12% de β -lactose em sua composição. O produto final, com fina granulometria e com a proporção entre beta e α -lactose obtidas, teve a característica de compressibilidade aprimorada, possibilitando a produção de medicamentos por compressão direta [1].

As propriedades físico-químicas da lactose são dispostas no Quadro 1.

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas da lactose

Propriedade	Informação
Nome	D-galactopiranosil-(1→4)-D-glicopiranoose
Peso molecular (forma monoidratada)	360,32 g mol ⁻¹
Coloração	Branca
Estado Físico (a 20 °C)	Sólido
Temperatura de fusão	202 °C
pH (100 g L ⁻¹ a 20 °C)	4 – 6
Solubilidade em água (a 20 °C)	161 g L ⁻¹

Fonte: MERCK, 2012; Japanese Pharmacopoeia, 2021.

Como observado no Quadro 1, a lactose apresenta alta solubilidade em água. Esse fenômeno pode ser explicado pela presença de diversos grupos hidroxila (-OH) (Figura 1), que conferem caráter polar à molécula, tornando-a hidrofílica. Além disso, o aumento da temperatura influencia positivamente a solubilidade da lactose, de modo que 1 L de água a 80 °C possui capacidade de solubilizar 1000 gramas do composto [21].

3.2. Introdução a cromatografia

A cromatografia é um método de separação poderoso, capaz de identificar e determinar os componentes de uma mistura complexa. Existe uma variedade de técnicas cromatográficas, e em todos os casos, se baseiam na separação de compostos pela diferença de velocidade com que são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel. Esse fenômeno é denominado eluição. E, apesar das diferentes aplicações da cromatografia, um ponto em comum entre todas elas é a utilização de duas fases, uma estacionária e outra móvel. Conforme a fase estacionária é suportada, os métodos cromatográficos podem ser classificados de duas formas: cromatografia em coluna e cromatografia planar [10].

Na cromatografia planar, a fase estacionária é suportada em uma placa ou nos poros de um papel. Nesse caso, a separação dos componentes ocorre devido ao fluxo da fase móvel, que percorre a fase estacionária por meio da capilaridade. Por outro lado, na cromatografia em coluna, a fase estacionária é confinada em um tubo estreito, e a fase móvel é forçada a passar por esse tubo, seja pela aplicação de pressão ou pela influência da gravidade [10].

Apesar de existir diversas técnicas e classificações de cromatografias, os próximos tópicos destacam duas técnicas cromatográficas importantes para este trabalho, a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na primeira delas, é tratado os princípios da técnica e como, atualmente, é feita a identificação de lactose. No segundo, trata-se os princípios da técnica por HPLC, além de um levantamento bibliográfico sobre os métodos existentes de análises de lactose e outros açúcares que auxiliaram no desenvolvimento do método a ser validado.

3.3. Identificação de lactose por cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é classificada como planar e se destaca por ser um método cromatográfico de baixo custo que permite a separação de pequenas quantidades de amostra. Neste tipo de cromatografia a separação é feita por adsorção. Na CCD, a fase estacionária é composta por uma placa revestida com uma fina camada de um material adsorvente, no qual é feita a adsorção da amostra. Os materiais adsorventes podem ser diversos, sendo as fases estacionárias mais comuns aquelas compostas por sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3), terra diatomácea, celulose ou poliamida. Entretanto, para que o método de separação seja eficaz, é fundamental considerar as interações entre o adsorvente e os componentes da amostra, uma vez que, a diferença entre essas interações favorece a separação dos compostos [23, 24].

Após a aplicação da amostra na fase estacionária, a placa é posicionada verticalmente em uma cuba cromatográfica na presença da fase móvel, também conhecida como eluente. O eluente, composto por um solvente ou uma mistura de solventes, sobe por capilaridade através dos espaços vazios devido a estrutura porosa do adsorvente. Ao entrar em contato com a amostra, promove a migração diferencial dos componentes. Já que, os compostos com maior afinidade pelo solvente serão carregados mais rapidamente pela fase estacionária, enquanto aqueles com maior afinidade pela fase estacionária se moverão mais lentamente [23, 24].

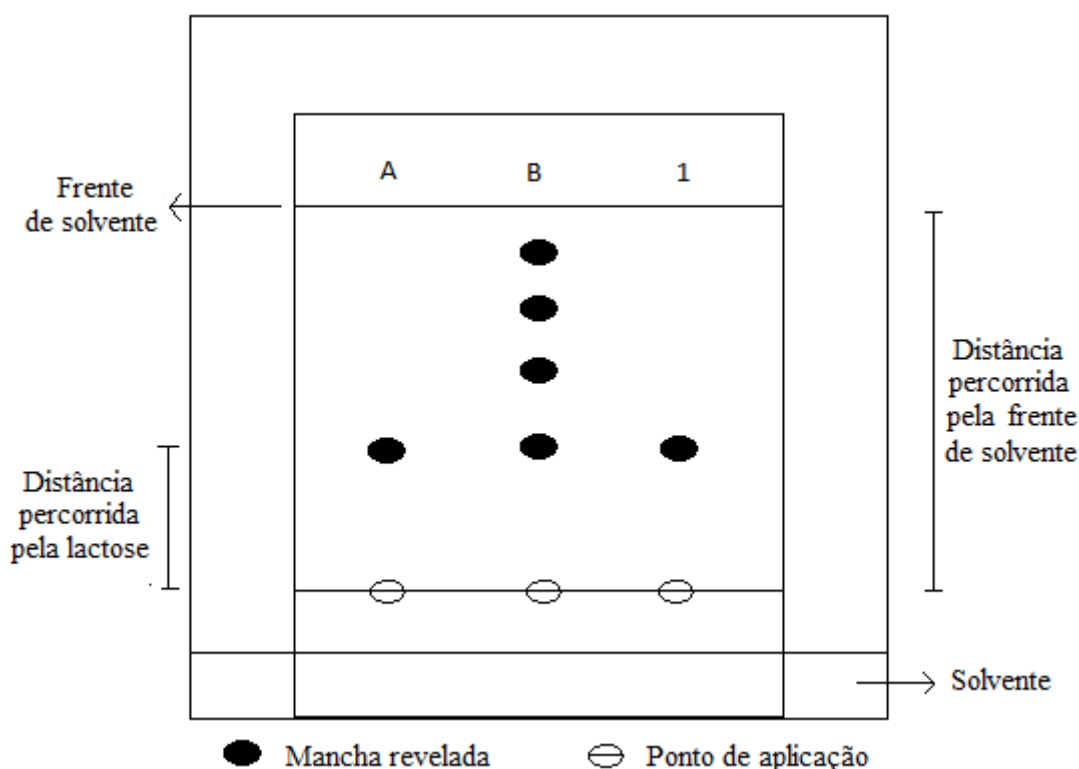
Segundo a Farmacopeia Brasileira, a sílica é o adsorvente mais comumente utilizado em métodos por CCD. Isto porque, trata-se de uma substância amorfa onde as amostras são adsorvidas através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo [23]. No caso da identificação de lactose, se utiliza a placa cromatográfica com uma fina camada de sílica gel de espessura equivalente a 0,25 mm. A sílica é escolhida para o método devido a seu caráter polar e a capacidade de realizar ligações de hidrogênio, que lhe confere maior afinidade com os açúcares. Este fenômeno é importante para a separação dos compostos e explica a utilização desta fase estacionária na identificação da lactose por diversos compêndios aceitos pela ANVISA, como a *United States Pharmacopeia* (USP) e a *Farmacopeia Argentina* (FA) [4, 6, 5].

O teste de identificação de lactose é realizado aplicando-se 2 μL das soluções padrão A de lactose monoidratada e de uma solução padrão B contendo lactose, glicose, sacarose e frutose em uma placa cromatográfica. Também são realizadas as aplicações das soluções contendo a matéria-prima a ser analisada. Todas as soluções são preparadas em concentrações de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando como diluente uma mistura de metanol e água na proporção de 3:2 (v/v). Após a secagem das amostras, a placa é posicionada verticalmente em uma cuba cromatográfica contendo uma mistura de dicloroetano, ácido acético glacial, metanol e água nas proporções de 10:5:3:2 (v/v). Os solventes devem permanecer selados na cuba por aproximadamente 1 hora, juntamente com um papel de filtro embebido na solução para a saturação do sistema [6, 5].

Quando o solvente atingir $\frac{3}{4}$ da altura da placa cromatográfica, esta deve ser removida e seca com ar quente. Neste momento, é necessário marcar a altura alcançada pelo solvente. Em seguida, a placa é colocada em outra cuba cromatográfica, cujos solventes também devem ter ficado selados por 1 hora. Após o solvente novamente percorrer $\frac{3}{4}$ da placa, ela é retirada e seca com ar quente. Por fim, aplica-se o reagente revelador, composto por uma solução de timol a 5 mg mL^{-1} em álcool etílico e ácido sulfúrico 19:1 (v/v). O sistema é, então, aquecido a 130°C por 10 minutos [5, 6].

A Figura 2 contém um esboço de uma cuba cromatográfica contendo solvente e a placa com os padrões A e B aplicados, e uma amostra (1) para identificação de lactose monoidratada. As manchas foram demonstradas para fins ilustrativos, isto porque, só são passíveis de visualização após o processo de revelação.

Figura 2 - Cuba cromatográfica para identificação de lactose



O teste descrito e ilustrado anteriormente só é considerado válido se forem reveladas quatro manchas discerníveis na posição em que foi aplicado a solução padrão B, contendo lactose, sacarose, glicose e frutose, respectivamente, desconsiderando quaisquer manchas na origem de aplicação. Isso é importante, pois garante a seletividade do método, já que demonstra que separação ocorre de forma eficaz, mesmo em compostos com propriedades e estruturas similares. Portanto, se for revelada apenas uma mancha na amostra (Figura 2, posição 1), com aparência e fator de retenção (R_f do inglês *retention factor*) iguais ao padrão A, o teste de identificação de lactose será considerado positivo [5, 6].

A seguir, a Equação 1 determina como é realizado o cálculo de R_f .

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela substância}}{\text{Distância percorrida pela frente de solvente}} \quad (01)$$

Alguns fatores podem alterar a velocidade de migração do solvente através da fase estacionária, como temperatura do ambiente, umidade, saturação da cuba cromatográfica e quantidade de amostra aplicada. E essas variações afetam o R_f [25]. De forma prática, o método de identificação de lactose por CCD tem se mostrado pouco reprodutível, já que em muitos casos não é possível visualizar as quatro manchas no padrão B, que invalida o teste. A força capilar é responsável pelo transporte da fase

móvel através da placa cromatográfica. Essa força é gerada pela redução da energia livre do solvente ao penetrar os poros da fase estacionária. No entanto, ela pode não ser suficiente para promover um fluxo adequado, resultando em uma velocidade de migração da fase móvel lenta e variável. Estas características frequentemente causam o alargamento das bandas cromatográficas e, em casos como a identificação da lactose, onde é usado um padrão combinado, pode levar a sobreposição de manchas, invalidando o teste [7]. Outros fatores que desfavorecem a utilização de CCD, incluem o caráter não automatizado do teste que requer maior mão de obra, possibilitando erros durante o processo, como a identificação incorreta da altura máxima percorrida pelo solvente e da distância percorrida pelas substâncias em análise.

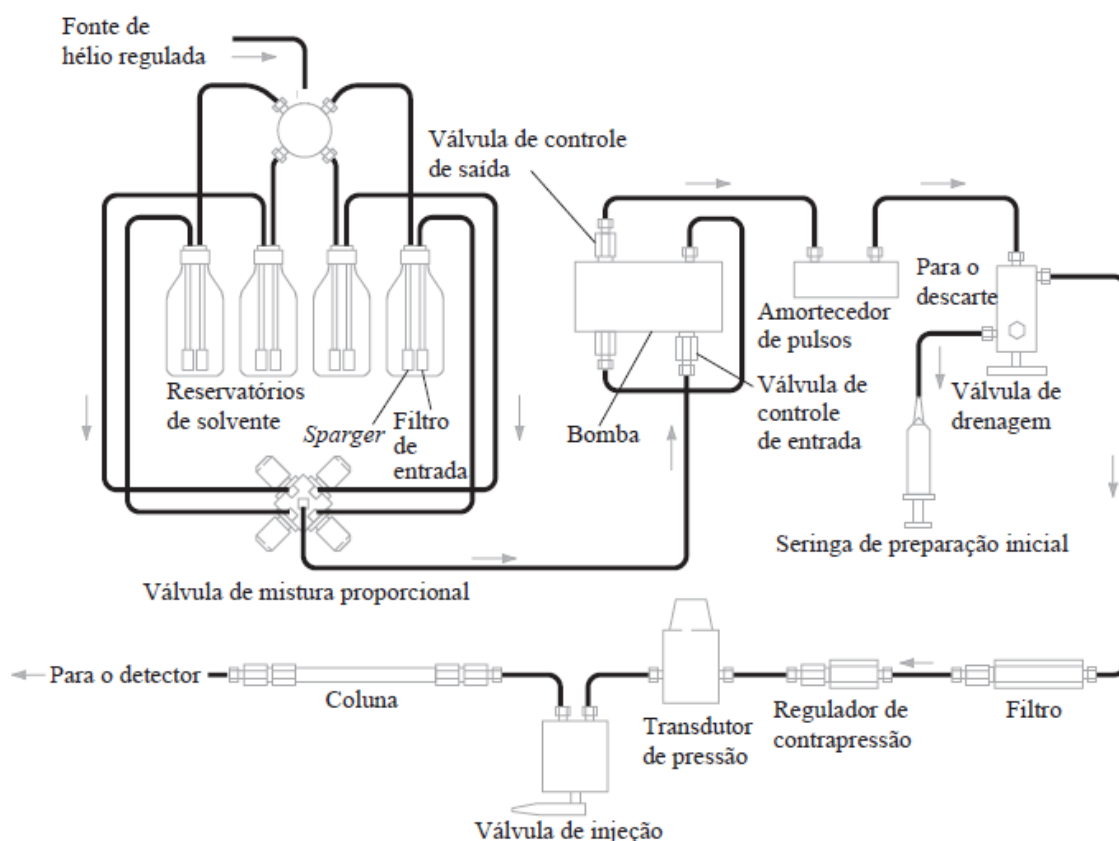
Por fim, na Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 658, de 30 de março de 2022, na qual a ANVISA dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos, é estabelecido a necessidade de procedimentos adequados que assegurem a identidade da matéria-prima contida em cada recipiente [8]. E, portanto, os testes de identificação devem ser realizados volume a volume, gerando uma alta demanda. Esse fato torna o método por CCD desafiador já que as placas cromatográficas possuem limite de amostras. Tornando o desenvolvimento da técnica por HPLC ainda mais atrativa.

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de cromatografia em coluna que se destaca, entre as técnicas cromatográficas, pela sua versatilidade e precisão. É amplamente utilizada para a separação de compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos. Além de se tratar de uma técnica automatizada, com amostradores automáticos, sistemas de análise de dados autônomos e geração de relatórios [9, 10].

Nessa técnica, a fase móvel é um solvente líquido ou uma mistura de solventes, enquanto a fase estacionária, finamente dividida, é aprisionada no interior de uma coluna de aço inoxidável. Devido à natureza das partículas que recheiam as colunas, na faixa de 3 a 10 μm , a técnica necessita de um sistema de bombeamento capaz de gerar pressões de até 6000 psi (libras/polegadas quadradas) para garantir o fluxo de solvente através da coluna [10]. A seguir, têm-se a figura 3, ilustrando os componentes de um HPLC.

Figura 3 - Diagrama de componentes HPLC



Fonte: Skoog et al., 2006, p.926.

Através de uma instrumentação sofisticada, as amostras são injetadas no sistema de alta pressão e transportadas pelo fluxo da fase móvel para o interior da coluna. A separação dos analitos ocorre devido ao equilíbrio de distribuição dos analitos entre as fases móvel e estacionária. Imediatamente, aqueles componentes da amostra que apresentam maior afinidade com a fase estacionária e maior peso molecular serão mais fortemente retidos, enquanto aqueles mais atraídos pela fase móvel migrarão com maior rapidez. Em uma separação efetiva os componentes da amostra serão eluídos na coluna separadamente, chegando ao detector em tempos distintos. Este intervalo permite que o detector identifique cada um dos analitos e gere um pico no cromatograma. Diversos tipos de detectores para HPLC estão disponíveis no mercado e a escolha adequada deve ser baseada na natureza da amostra de interesse, uma vez que não há detectores que sejam universais e de alta sensibilidade [9, 10].

Os detectores mais comumente acoplados a HPLCs realizam o monitoramento do eluente por meio da absorção de ondas eletromagnéticas na faixa do espectro UV-Vis (ultravioleta-visível). Eles são classificados como espectroscópicos, baseando-se nas transições eletrônicas sofridas por elétrons, que, ao serem incididos por radiação

eletromagnética em comprimentos de ondas específicos, podem ser excitados para níveis mais energéticos. Usualmente, as absorções observadas são correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. Seguindo os princípios da Lei de Lambert-Beer, conforme Equação 2 [9, 10].

$$A = \varepsilon (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}) \times b (\text{cm}) \times C (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \quad (2)$$

A equação descreve o comportamento da absorção, onde A representa a absorbância, ε é o coeficiente de absorvidade molar, inerente a cada substância em um dado comprimento de onda, b corresponde ao caminho óptico percorrido pela luz através da amostra, e C é a concentração do analito que gera o sinal. Consequentemente, como o caminho óptico em detectores baseados em absorção UV/Vis é fixo, a absorbância dos compostos é sensível tanto às variações na concentração da amostra quanto às mudanças no comprimento de onda da luz incidente [9].

A absorbância também pode ser definida como a função logarítmica da transmitância (T), que por sua vez, pode ser obtida por meio da razão entre a intensidade de luz transmitida e a intensidade de luz incidente na amostra [9].

O detector por índice de refração (RID, do inglês *Refractive Index Detector*) é considerado um detector universal, tal fato se dá por sua característica de detecção que ocorre por meio da medida constante do índice de refração do eluato. Esse índice é alterado quando as moléculas do analito são presentes na fase móvel, e a diferença no índice de refração dá origem ao sinal cromatográfico. Portanto, o RID pode ser amplamente aplicado já que qualquer alteração na composição do eluato gera uma resposta no detector devido à mudança do índice de refração. Porém, é um detector com sensibilidade limitada, o que pode ser indesejável em alguns casos onde o analito se encontra em baixas concentrações [10].

Métodos analíticos utilizando o RID são vistos em análises onde os analitos não possui cromóforos. Ou seja, é indicado para análises de compostos incapazes de absorver a radiação eletromagnética na região do ultravioleta ao visível, o que impossibilita o uso destes detectores espectrofotométricos em suas análises. Entretanto, existem vantagens atreladas a utilização dos detectores UV/Vis, como a possibilidade de emprego de fase móvel em gradiente, que pode oferecer melhorias na resolução do cromatograma, ao promover o distanciamento dos picos. Ou a minimização do tempo de aquisição dos dados, fazendo com que a eluição ocorra mais rapidamente [9, 11].

A classificação do método por HPLC pode ser baseada no mecanismo de separação ou no tipo de fase estacionária utilizado, englobando modalidades como partição (cromatografia líquido-líquido), adsorção (cromatografia líquido-sólido), troca iônica (cromatografia de íons), exclusão, afinidade e cromatografia quiral [10].

A coluna utilizada no HPLC determinará o mecanismo de separação e deve considerar a natureza dos compostos a serem separados. Para a separação de compostos de baixa massa molar, recomenda-se o uso de mecanismos de partição em fase reversa, fase normal ou troca iônica, em ordem crescente de polaridade. Para compostos de alta massa molar, é interessante considerar outros mecanismos de separação, como a exclusão de tamanho, utilizando permeação em gel para compostos apolares e filtração em gel para compostos polares [10].

Aproximadamente 70% das análises realizadas por HPLC utilizam colunas de fase reversa, sendo a coluna composta por grupos octadecilsilanos (C18) a mais popular dentro dessa classe. A cromatografia de fase reversa é caracterizada pelo uso de uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, que promove a separação de compostos de baixas polaridades ou apolares, devido à forte interação entre as moléculas apolares e a fase estacionária [9, 26]. Contudo, apresenta limitações na separação de moléculas polares e iônicas. Nessas situações, a cromatografia em fase normal pode ser uma alternativa, nela se utiliza uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, o que favorece a interação dos compostos polares e a fase estacionária. Entretanto, essa técnica apresenta a desvantagem de não permitir o uso de água, devido à sua forte interação com a coluna cromatográfica. Essa restrição dificulta a separação de compostos polares, cuja solubilidade em solventes apolares é frequentemente baixa [27].

Para superar essas limitações, foi desenvolvida a cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction chromatography*), que emprega uma fase móvel composta predominantemente por solventes orgânicos (geralmente acima de 70% v/v), combinados com pequenas proporções de água ou soluções tampão. Já a fase estacionária possui grupos funcionais polares que favorecem interações com moléculas hidrofílicas. Geralmente, são compostas por sílica ou suportes de sílica quimicamente modificados com grupos ciano, diol, amida, alquiamida, aminas, grupos sulfônicos e zwitteriônicos, entre outros. Assim, a HILIC é indicada para a separação de

compostos polares, permitindo maior retenção desses compostos e eficiência na separação [27, 28].

3.5. Métodos de análise de lactose e outros açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência

Diversos métodos para a análise de açúcares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram descritos na literatura, envolvendo detectores RID e UV/Vis. Em uma abordagem comparativa, Jalaludin e Kim (2021) investigaram a viabilidade do uso de detectores UV como alternativa aos detectores RID, amplamente utilizados em análises de açúcares. Isto porque, é observado que os açúcares são capazes de absorver a radiação eletromagnética em comprimentos de onda abaixo de 200 nm. Neste sentido, os autores avaliaram dois métodos distintos. No primeiro, os detectores foram empregados de forma simultânea, com fase móvel composta por água e acetonitrila (25:75 v/v), com fluxo de 1,0 mL/min e tempo de aquisição de dados de 15 minutos. No segundo método, aplicando apenas o detector UV, a fase móvel era composta de 35% de água e 65% de acetonitrila nos primeiros 4 minutos e no tempo de 4 a 10 minutos a concentração da água foi decaindo para 20%, enquanto a acetonitrila se tornava 80% da composição da fase móvel, mantendo o fluxo e a coluna utilizados no primeiro método. Os resultados encontrados indicaram desempenho similar. Mas a detecção por UV, para o método em gradiente de fase móvel, apresentou vantagens que incluem menor tempo de análise e redução do consumo de reagentes [11].

A presença de grupos hidroxila nas estruturas dos açúcares confere a esses compostos uma alta afinidade por solventes polares. Nesse contexto, a eficiência da eluição dos carboidratos aumenta conforme a polaridade do solvente se intensifica. No entanto, o uso de altas concentrações de água pode prejudicar a retenção adequada dos compostos na fase estacionária, resultando em uma diminuição na resolução do cromatograma. Em outras palavras, a capacidade de separação entre os compostos é comprometida. Em vista disso, os autores optam por utilizar uma fase móvel composta por acetonitrila e água, com a acetonitrila variando de 70% a 85% e a água de 30% a 15% em termos de proporção v/v [11, 29, 30, 31, 32, 33].

Outro fator importante é a escolha adequada da fase estacionária, que determinará o mecanismo de separação. No caso dos açúcares, a presença de grupos polares em suas estruturas deve ser considerada. Em função disso, não é viável a utilização de mecanismos de separação baseados em fase reversa, isto porque, a fase estacionária

hidrofóbica não fornecerá as interações necessárias com os analitos para que haja uma migração diferencial e, assim, a separação dos compostos. Para contornar essa limitação, diversos autores optam pelos mecanismos HILIC, utilizando colunas de sílica cuja superfície são modificadas com grupos polares, que favorecem a retenção de compostos polares. Dentre essas, as colunas com grupos aminos são frequentemente utilizadas para a separação de açúcares, pois as interações de ligação de hidrogênio entre os grupos amino e os grupos hidroxila dos açúcares melhoram a retenção e a separação dos compostos [9, 11, 33, 26, 30, 32].

3.6. Validação de método analítico

A validação analítica é o processo de demonstrar, de forma experimental e sistemática, por meio de evidências objetivas, que um método atende aos requisitos específicos para o seu uso, garantindo a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos [16, 17]. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) definem critérios e orientações para a validação de métodos analíticos.

A ANVISA, por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, determina que todos os métodos analíticos voltados a análises de insumos farmacêuticos, medicamentos ou insumos biológicos devem estar em conformidade com os critérios estabelecidos na Resolução. A utilização de um método analítico não descrito em um compêndio oficial reconhecido pela ANVISA requer validação analítica. E, portanto, deve ser submetido aos parâmetros estabelecidos e brevemente definidos no Quadro 2.

Quadro 2 - Definição de parâmetros de validação analítica

Parâmetro	Definição
Exatidão	Grau de concordância dos resultados individuais obtidos pelo método a ser validado em relação a um valor tido como verdadeiro
Precisão Repetibilidade	Proximidade dos resultados obtidos pelo método sob as mesmas condições de operação, mesmo analista, mesma instrumentação e mesma corrida analítica
Precisão Intermediária	Proximidade entre os resultados obtidos pela mesma amostra, porém, em dias diferentes e realizada por operadores distintos
Seletividade ⁽³⁾	Capacidade do método de identificar ou quantificar o analito distinguindo-o de outros compostos similares
Limite de detecção	Menor quantidade do analito que pode ser detectado pelo método, de forma segura
Limite de quantificação	Menor quantidade de analito que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis
Linearidade	Capacidade do método de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais a quantidade de analito
Robustez	É um parâmetro opcional que avalia a capacidade do método de oferecer resultados confiáveis na presença de pequenas variações

Fonte: ANVISA, 2017; INMETRO, 2020.

A validação analítica deve respeitar a natureza do método e as características do analito. Neste caso, a RDC nº 166/2017, define os seguintes parâmetros a serem avaliados considerando o método de análise, conforme Quadro 3.

Quadro 3 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento ⁽¹⁾
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽²⁾	Não	Sim ⁽²⁾
Seletividade ⁽³⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não ⁽⁴⁾	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não ⁽⁴⁾
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim

⁽¹⁾ Doseamento inclui dissolução (quantificação), uniformidade de conteúdo ou potência.

⁽²⁾ Quando realizado reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

⁽³⁾ Na identificação pode ser necessário dois ou mais procedimentos para a discriminação necessária.

⁽⁴⁾ Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: adaptado de ANVISA, 2017, p.18-19.

Já o INMETRO, através do documento DOQ-CGCRE-008/2020, define os parâmetros para validação analítica caracterizando os tipos de ensaio em dois grupos, os qualitativos e os quantitativos. O último, deve abarcar os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, recuperação e, opcionalmente, robustez. Para ensaios classificados como qualitativos o documento orienta a utilização de seletividade, limite de detecção, e de forma opcional, robustez. Nesse contexto, considerando o desenvolvimento de método de identificação, em que o tipo de ensaio é qualitativo, os parâmetros de validação a serem considerados, são: seletividade e limite de detecção e robustez (opcional) [16, 17].

3.6.1. Seletividade

A seletividade de um método é definida pelo seu poder de identificar e quantificar um analito na presença de outros compostos, que sejam provenientes da matriz ou de potenciais interferentes [17]. Para comprovação de seletividade é necessário demonstrar que o método desenvolvido é capaz de identificar, de forma inequívoca, a presença do analito. E, o método é considerado seletivo quando apresenta resultado negativo ao ser aplicado em compostos estruturalmente similares, garantindo a exclusividade na detecção do analito de interesse [16].

A avaliação da seletividade pode ocorrer de diversas formas. Por exemplo, através de análises de amostras contendo o analito e de materiais de referências pelo método desenvolvido e métodos previamente validados. Buscando identificar e quantificar o

analito na presença de interferentes, em casos positivos, se obtém evidências para dar confiabilidade no método. Outra forma de avaliar a seletividade, é por intermédio de análises em amostras com possíveis interferentes na presença do analito de interesse. Caso seja observado uma alteração da resposta do analito de interesse na presença de possíveis interferentes, o método não pode ser considerado seletivo e deve ser reformulado [17].

Em caso de matrizes complexas, o parâmetro de seletividade deve ser acompanhado com testes para avaliar efeito matriz. Esses avaliam se os possíveis componentes existentes na matriz, tudo que compõe a amostras exceto o analito, podem gerar incremento ou atenuação na resposta do método ao analito [16].

O efeito matriz pode ser realizado de duas formas, a primeira é realizada quando existe matriz sem o analito disponível ou um grupo satisfatório de amostras de referência e a segunda forma caso não exista a matriz sem analito disponível. A primeira delas, dois grupos são preparadas, um contendo a matriz e outro sem matriz, ambos com os mesmos níveis de concentração. Para avaliação do parâmetro, podem ser aplicados testes de hipóteses *f* (*Snedecor*) e *t* (*Student*), que avaliam, respectivamente, se as variâncias e as médias são estatisticamente equivalentes na presença e ausência de matriz. Caso não exista matriz sem analito disponível, são preparadas duas curvas analíticas com os mesmos níveis de adição de analito em cada concentração. A primeira curva deve ser construída adicionando o analito diretamente à matriz da amostra e a segunda curva deve ser preparada sem a presença da matriz da amostra. Nesse caso, utiliza-se o teste *t* para verificar se as inclinações obtidas para cada uma das curvas são estatisticamente equivalentes, caso sejam, pode-se inferir que a matriz não tem efeito na resposta do método [16, 17].

Além disso, no caso de métodos cromatográficos, a seletividade deve ser comprovada por meio da pureza cromatográfica do sinal do analito. Essa avaliação consiste em verificar a pureza do pico cromatográfico através de sua homogeneidade espectral [16].

3.6.2. Limite de Detecção

Outro parâmetro a ser considerado é o limite de detecção do método. Esse parâmetro é fundamental, uma vez que, a probabilidade de detecção do analito pelo método não é alterada rapidamente de “0” para “1”. Logo, não é possível determinar de forma absoluta a completa ausência de analitos em uma amostra. Assim, o limite de detecção é

definido como a quantidade mínima de analito que pode ser detectada pelo método desenvolvido, com segurança. O parâmetro pode ser obtido de algumas formas, que são: por método visual, relação sinal/ruído, pela determinação do branco e por parâmetros da curva de calibração [16, 17].

Em casos onde o procedimento analítico tenha ruído na linha de base e a região do ruído da linha de base seja a mesma da região correspondente a resposta ao analito, o limite de detecção pode ser inferido através da relação sinal/ruído. Essa relação deve obedecer a condição de 2/1 (resposta do analito/ruído) para que o limite de detecção determinado seja considerado uma concentração onde o analito pode ser detectado com confiança [16, 17].

Para métodos quantitativos, o limite de detecção pode ser obtido a partir de curvas de calibração, por intermédio da Equação 3 [16, 17].

$$LD = \frac{3,3 s}{IC} \quad (3)$$

Em que LD é limite de detecção, s é o desvio padrão da curva e IC sua inclinação.

E por fim, existem duas definições realizadas a partir do branco, ou seja, a matriz sem a presença do analito. A primeira é calculada conforme Equação 4 [16, 17].

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \times s \quad (4)$$

Onde $\bar{X}$ é a média da resposta obtida para o branco, s é o desvio padrão amostral dos brancos e t é obtido pela distribuição *Student* e depende do nível de confiança e do número amostral. De forma parecida com a anterior, a outra alternativa é utilizada quando o branco não gera resposta. Nesse cenário, é utilizado um branco fortificado com a menor concentração aceitável do analito e o limite de detecção é calculado conforme Equação 5 [16, 17].

$$LD = 0 + t_{(n-1, 1-\alpha)} \times s \quad (5)$$

Nesse caso, s é o desvio padrão amostral dos brancos fortificados e t é obtido pela distribuição *Student* e depende do nível de confiança (α) e do número amostral (n) que definirá os graus de liberdade (n-1). A definição do limite de detecção através do método de avaliação/percepção visual normalmente é realizado através de diluições sucessivas do analito até que a menor concentração que seja possível distinguir do branco seja encontrada [16, 17].

3.7. Análises Estatísticas

A estatística, como parte integrante de uma metodologia científica, envolve a coleta, redução e a modelagem de dados, possibilitando a realização de inferências sobre uma

determinada população cujos os dados foram coletados. Nesse contexto, a inferência estatística requer a formulação de previsões, que serão testadas estatisticamente com o objetivo de embasar a tomada de decisão [34].

Tendo em vista o objetivo do presente trabalho serão utilizados testes estatísticos, detalhados a seguir, para avaliar os parâmetros de seletividade e limite de detecção. Pensando nisso, os próximos tópicos abordam testes de hipóteses (3.7.1), para contextualizar os testes de hipóteses abordados em seguida, como o teste de Grubbs para Análise de *Outliers* (item 3.7.2), o teste de Shapiro-Wilk para análise de normalidade dos dados (item 3.7.3), o teste de Durbin-Watson que avaliar aleatoriedade de dados (item 3.7.4), o teste F na análise de variâncias (item 3.7.5) e o teste t para avaliação das médias (3.7.6). O levantamento bibliográfico visa embasar a metodologia de pesquisa e as discussões sobre a validade do método desenvolvido para a identificação de lactose monoidratada e detecção de sacarose, frutose e glicose.

3.7.1. Teste de hipóteses

Os testes de hipóteses têm como objetivo oferecer métodos que avaliem os resultados obtidos a partir de amostras. Esses métodos são fundamentais para estimação de parâmetros em etapas de análise de dados de experimentos comparativos. Os testes de hipóteses dão suporte a afirmações sobre parâmetros populacionais obtidos por um conjunto amostral, ao verificar se os resultados sustentam ou contradizem as hipóteses propostas. [34, 35].

De forma geral, denominamos como hipótese nula (H_0) aquela que está sendo colocada a prova e como hipótese alternativa (H_1) a que será aceita quando H_0 for rejeitada [34]. Entretanto, a verdade ou falsidade de uma hipótese não pode ser definida com total certeza, a menos que se examine a população inteira. Em vista disso, é importante considerar a probabilidade da conclusão do teste estar incorreta [35].

Existem dois tipos de erros que podem ocorrer ao aceitar ou rejeitar uma hipótese. O tipo II, que corresponde a probabilidade de não rejeitar a H_0 quando ela é falsa, é representado pela probabilidade β . Outro erro possível é denominado erro tipo I, caracterizado pela probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira. Esse erro é representado pela probabilidade α , também chamada de nível de significância. Quanto menor o valor de α , maior será a confiança no resultado amostral para rejeitar ou não a hipótese nula. Normalmente, fixa-se α em 5% ($\alpha = 0,05$), 1% ($\alpha = 0,01$) ou 0,1% ($\alpha = 0,001$) [34].

Uma das formas de reportar resultados testes de hipótese inclui considerar a decisão do teste em α . Entretanto, realizar uma conclusão apenas baseado no nível de significância, pode levar a afirmações inadequadas. Isto porque, é considerada apenas a proximidade entre o valor do teste e as regiões de rejeição. Pensando nisso, a abordagem do valor P tem sido largamente aplicada em testes estatísticos de hipóteses. De fato, o valor P é tido como a probabilidade de que a estatística de teste assumirá um valor tão extremo ou mais extremo que o valor observado quando a hipótese nula for verdadeira. Ou seja, o valor P fornece o menor nível de significância que conduz a rejeição da hipótese nula H_0 . Sendo assim, caso a estatística de teste assuma um valor maior que o nível de significância, a hipótese nula é aceita [35].

Muitos testes estatísticos são baseados em hipóteses e permitem avaliar diferentes aspectos dos dados, ao realizar conclusões sobre uma população. Nesses testes, é possível identificar a presença de valores anômalos (*outliers*) (item 3.7.2), verificar a normalidade dos dados (item 3.7.3), e analisar parâmetros variância (3.7.4) e média (3.7.5) populacional.

3.7.2. Análise de *Outliers*

Fatores diversos podem ocasionar a obtenção de valores discrepantes, como erros de anotação, diluições imprecisas, falhas em equipamentos, entre outros. No entanto, em uma distribuição normal, existe a possibilidade de dispersão de apenas um valor dentro de um conjunto de dados. Assim, ao rejeitar esse valor, os resultados do conjunto podem ter a uma média incorreta ou a um desvio padrão inferior ao real. No entanto, erros também seriam incorporados no resultado, caso o valor aberrante (*outlier*) seja considerado como resultado válido [36].

Em vista disso, alguns testes de hipóteses são utilizados para avaliação de valores suspeitos. Um desses métodos é o Teste de Grubbs, utilizado em conjuntos de dados com distribuição normal. O teste visa avaliar resultados individuais dentro de um conjunto e verificar se essa amostra faz ou não parte da população. Nele, a hipótese nula define que o valor suspeito pertence a população e a hipótese alternativa indica que o dado é um *outlier*. A estatística G é calculada por intermédio da equação 6 [36].

$$G = \frac{|Valor\ suspeito - \bar{X}|}{s} \quad (6)$$

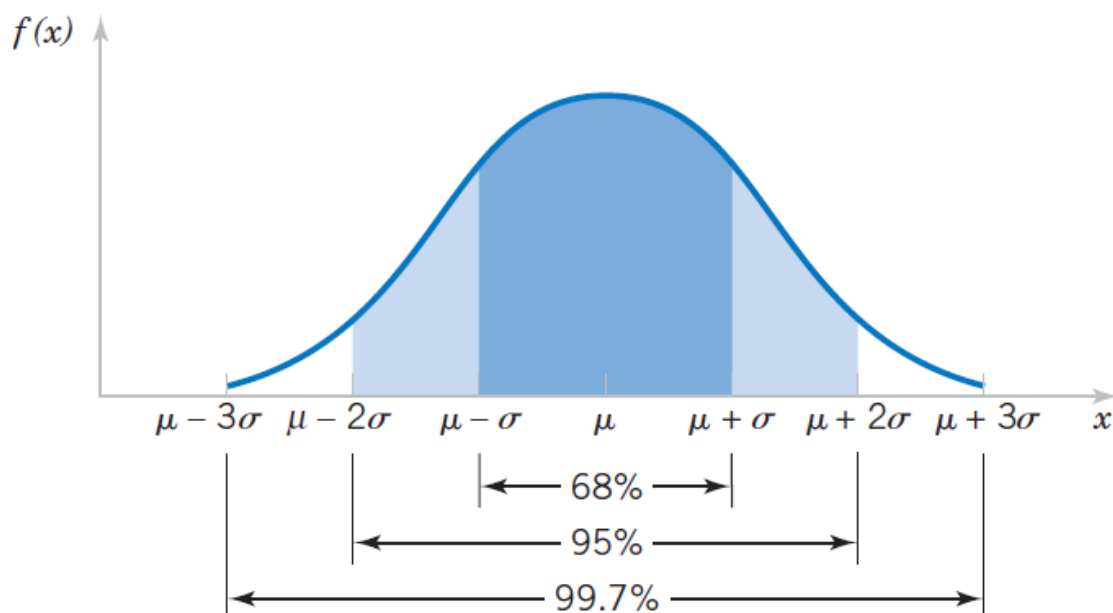
Na equação, o módulo da diferença entre o valor suspeito e a média (incluindo o suspeito) é dividido pelo desvio padrão. O G crítico é obtido considerando o nível de significância e o tamanho do conjunto amostral. E, quando é maior que o G calculado, a

hipótese nula é aceita e podemos afirmar estatisticamente e, com o nível de confiança escolhido para o teste, que o resultado suspeito faz parte da população. Caso contrário, o valor é considerado aberrante e o teste pode ser reaplicado para verificar a presença de outros valores suspeitos [36].

3.7.3. Normalidade

Variadas técnicas estatísticas assumem que a distribuição dos dados é normal. Em vista disso, as interpretações estatísticas poderão ser inválidas caso os dados não se adequem à normalidade [37]. Uma distribuição com média μ e desvio padrão σ é considerada normal quando seu gráfico de densidade de probabilidade assume um formato de um sino. A Figura 4 exemplifica uma distribuição normal e demonstra as probabilidades associadas a ela [35].

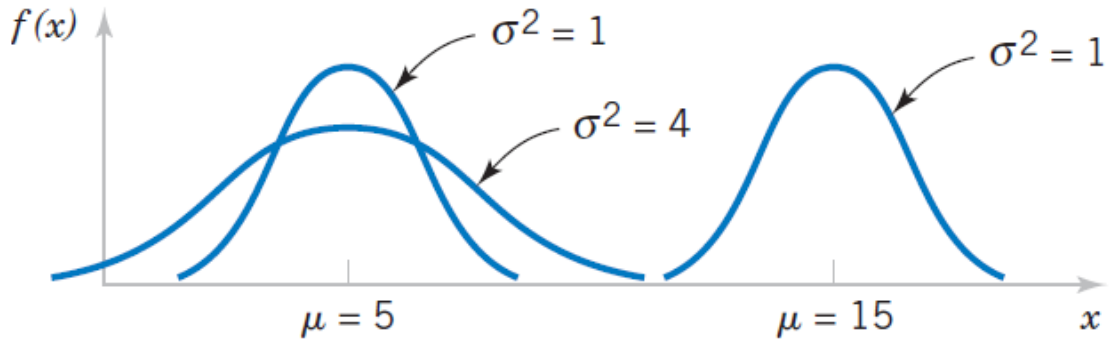
Figura 4 - Gráfico de densidade de probabilidade associado à distribuição normal



Fonte: Montgomery; Runger, 2011, p. 120.

A curva apresentada representa o padrão geral, mas, sendo considerada uma distribuição normal, pode variar em relação às médias, deslocando-se para a direita ou para a esquerda no eixo cartesiano. Além disso, a curva pode apresentar variações em sua largura, tornando-se mais estreita ou mais larga, dependendo da dispersão dos dados, conforme Figura 5 [35].

Figura 5 - Variações de distribuições normais



Fonte: Montgomery; Runger, 2011, p. 119.

Existem algumas formas de se verificar a normalidade dos dados: pode ser por métodos gráficos ou métodos numéricos. Os primeiros podem ser feitos por intermédio de gráficos quantil-quantil normal (Gráfico QQ) ou histogramas. Esses gráficos, embora muito utilizados, necessitam de suportes para concluir que o conjunto de dados segue uma distribuição normal. Pensando nisso, métodos numéricos e testes formais de normalidade são ideias para fornecer evidências suficientes que indiquem a normalidade dos dados [37].

Entre os métodos numéricos, a normalidade pode ser testada por meio de testes de curtose ou assimetria, caracterizados por proeminência da cauda ou do pico. Já para teste formais, os mais comuns são o teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling e Lilliefors [37].

Dentre os testes formais, o teste Shapiro-Wilk é o considerado mais poderoso e o primeiro capaz de detectar desvios da normalidade, por análises de curtose, assimetria ou ambas [37]. A estatística W do teste é representada pela Equação 7 [38].

$$W = \frac{b^2}{S^2} \quad (7)$$

Onde, S^2 e b são descritos pelas Equações 8 e 9, respectivamente [38].

$$S^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (8)$$

$$b = \sum_{i=1}^k a_{n-i+1} (x_{n-i+1} - \bar{x}) \quad (9)$$

Quando n é ímpar, $n = 2k$ e quando n é par, $n = 2k+1$. Já os valores de a_{n-i+1} são tabelados e dependentes do número de amostras. Nesse teste, a hipótese nula indica a normalidade dos dados e a alternativa que os dados não seguem uma distribuição normal. A avaliação do teste é feita confrontando W e $W_{\text{crítico}}$ e, se $W < W_{\text{crítico}}$, a hipótese nula é rejeitada e se conclui que os dados não são normais, considerando o

nível de significância predefinido. Os valores da estatística de teste, W , variam entre 0 e 1, e quando muito próximo ao 0 fornece indicativo de não-normalidade [38]. O teste também pode ser avaliado por intermédio de software de análise de dados estatísticos. Esses realizam o cálculo do valor P , neste caso, o valor P calculado deve ser maior que o nível de significância escolhido.

3.7.4. Aleatoriedade

Para emprego de métodos estatísticos, como teste F e teste t , é necessário averiguar se os dados são aleatórios. Neste caso, pode ser realizada a autocorrelação serial entre os resultados obtidos considerando uma sequência temporal. Ou seja, é importante garantir que um método analítico não seja tendencioso e não apresente um padrão de variação ao longo de replicatas [39].

O teste de Durbin-Watson é muito utilizado na verificação de correlação de variação entre observações sucessivas. O teste é representado por meio da Equação 10 [39, 40].

$$DW = \frac{\sum (e_t - e_{t-1})^2}{\sum e_t^2} \quad (10)$$

Em que, e_t são os resíduos obtidos pelo modelo dos dados, que deve ter distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . A avaliação do teste é feita através da relação da estatística do teste, DW . E, a hipótese nula, H_0 , afirma que não há correlação temporal, ou seja, $p = 0$, onde p é o coeficiente de autocorrelação dos resíduos. Já a hipótese alternativa, H_1 , indica que $p \neq 0$ (ou $p > 0$), o que determina que existe relação temporal entre os dados [39, 40].

O teste pode ser manipulado através de *softwares* estatísticos, neste caso, a hipótese nula é confirmada a partir do valor P , ou seja, H_0 é aceita quando valor $P > (\alpha = 0.05)$, em um nível de confiança de 95%.

3.7.5. Análise de Variância

Na presença de dois grupos de amostras independentes retirados da mesma população, é importante contrastar S^2_1 e S^2_2 , para avaliar se as variâncias entre os grupos são equivalentes. Análise de variância é realizada utilizando uma das distribuições mais comuns, a distribuição F . Nessa análise, avalia dois grupos de tamanhos n_1 e n_2 , retiradas de populações normais de mesma variância, σ^2 [34].

Para testar se as variâncias são equivalentes, o teste F (*Snedecor*) a H_0 indica igualdade entre as variâncias populacionais ($\sigma^2_1 = \sigma^2_2$) e a H_1 infere que $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$. A estatística do teste é calculada conforme Equação 11 [36].

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (\sigma_1^2 > \sigma_2^2) \quad (11)$$

Considerando os graus de liberdade, $n_1 - 1$ e $n_2 - 1$, e o nível de confiança estabelecido, é possível contrastar o F calculado com o $F_{\text{crítico}}$. E, quando $F < F_{\text{crítico}}$, a hipótese nula é aceita e as variâncias são consideradas equivalentes para o nível de confiança utilizado. Em softwares, normalmente o teste é realizado utilizando o valor P, quando valor P é maior que o nível de significância, a hipótese nula é aceita [35].

O teste avalia a homogeneidade de variâncias sendo possível visualizar se um método gera dados equivalentes a um método previamente validado. Ou, se existe efeito matriz ao comparar dados provenientes de amostras independentes contendo apenas o analito e amostras com analito na presença da matriz na qual o teste será aplicado. Nestes casos, a hipótese nula (H_0) indica que o método novo não afeta a precisão dos resultados ou a matriz não tem efeito sobre a precisão do método, respectivamente. E, a hipótese alternativa (H_1) indica que os métodos possuem variâncias diferentes, quando aplicado para comparação de métodos, ou que a matriz não tem efeito sobre a precisão do método nos níveis de concentração estudados, quando avalia efeito matriz [17].

3.7.6. Análise de Médias

Ao lidar com um conjunto de dados pode haver a necessidade de comparar a média do grupo com um valor de referência. Para isso, é possível recorrer a utilização do teste t. Considerando que os dados amostrais são independentes e retirados de uma população que segue o modelo de distribuição normal [35].

Nessa situação, o teste de hipótese é formulado e a hipótese nula, H_0 , indica igualdade entre a média e a hipótese alternativa, H_1 , que a média não é equivalente ao valor de referência. A estatística teste pode ser calculada conforme Equação 12 [35].

$$T_0 = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \quad (12)$$

Em que, $\bar{X}$ é a média amostral, μ_0 corresponde ao valor de referência que define a média populacional, s é o desvio padrão amostral e n o número amostral. Após a obtenção de T_0 , ele é utilizado para definir o valor P, considerando os graus de liberdade e o nível de significância, através da tabela de distribuição t. Logo, se o valor P obtido é maior que o nível de significância (α), a hipótese nula é aceita e conclui-se que média é equivalente ao valor de referência, considerando o nível de confiança utilizado [35].

Em muitos casos é necessário realizar a comparação entre grupos e verificar se, por exemplo, dois métodos diferentes para análise produzem resultados equivalentes ou se

uma alteração em um método pode modificar a resposta ao analito. Nesses casos, pode ser desejável a utilização do teste t pareado ou do teste t para conjuntos independentes [35].

O teste t pareado é voltado para dados que foram coletados aos pares, por exemplo, ao realizar duas leituras diferentes para uma única amostra, as observações são obtidas aos pares a cada amostra analisada. Assim, os resultados obtidos formam um conjunto com n observações pareadas, com médias equivalente a μ_1 e μ_2 e variâncias σ^2_1 e σ^2_2 . Esse conjunto é manipulado, de forma a criar uma nova variável denominada D_j e caracterizada pela diferença entre os pares. D_j segue a distribuição normal, com média μ_D e variância σ^2_D . Nesse sentido, a Equação 13 determina a estatística do teste [35].

$$T_0 = \frac{\bar{D} - \Delta_0}{s_D / \sqrt{n}} \quad (13)$$

Nesse caso, $\bar{D}$ é definido como a média das diferenças entre os pares de observações, Δ_0 é a diferença definida pela hipótese nula, normalmente definida como 0 quando se quer testar a igualdade entre os grupos, s_D é o desvio padrão das diferenças e n é o número amostral. Por fim, o teste t para conjunto de amostras independentes de médias possibilita inferir se as populações possuem médias iguais ou diferentes [34]. A estatística do teste é calculada conforma Equação 14.

$$T_0 = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2 - \Delta_0}{s_P / \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (14)$$

Em que, $\bar{X}_1$ e $\bar{X}_2$ são as médias amostrais do primeiro e segundo grupo, Δ_0 é a diferença definida pela hipótese nula, em que, para comparar igualdade entre grupos é utilizado $\Delta_0 = 0$, s_P é o desvio padrão combinado dos dois grupos e n_1 e n_2 são o número de amostras no grupo 1 e no grupo 2, respectivamente. Para ambos os testes, H_0 é a diferença entre as médias das populações é igual a Δ_0 e H_1 pode ser formulada de três formas: (1) a média é diferente de Δ_0 ; (2) a média é maior que Δ_0 ; e (3) a média é menor que Δ_0 . No primeiro caso, trata-se de um teste bicaudal (duas caudas) e os dois últimos testes são de uma cauda. Para a conclusão do teste o t_0 é confrontado com o $t_{\text{crítico}}$ que é tabelado e dependente do número de caudas, dos graus de liberdade e do nível de significância do teste. Se $t_0 > t_{\text{crítico}}$ a hipótese nula é aceita. Outra forma de interpretação é utilizando valor P, quando valor P é maior que o nível de significância H_0 é aceita [35].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, será abordado o método a ser validado, adaptando a proposta de Wang *et al.* (2021), Jalaludin e Kim (2021) Tiwari, *et al.* (2023), Sesta (2006) e Xinmin, *et al.* (2008) os respectivos reagentes, materiais e equipamentos em cada etapa de validação. Os tópicos seguintes detalham o percurso realizado para o desenvolvimento e validação analítica. Para avaliar as melhores condições para desenvolvimento do método, foram avaliados a coluna a ser utilizada, os solventes empregados como fase móvel assim como suas proporções e a escolha do detector considerando suas características e as necessidades de aplicação. Em seguida, foram traçadas estratégias de para validação analítica, considerando os parâmetros de seletividade e limite de detecção.

4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram: acetonitrila grau HPLC Biograde (Lote: 2400012634), padrão frutose USP (Lote: R168W0), padrão D-(+) glicose USP (Lote: R18560), padrão lactose monoidratada USP (Lote: R084R0) e padrão sacarose Farmacopeia Britânica (Lote: 4278) e água ultrapurificada e purificada.

As duas últimas são produzidas no Laboratório do Serviço de Controle Físico Químico da Fundação Ezequiel Dias (Funed) pelo sistema de purificação de água Millipore Integral A⁻¹⁰ TAG SPA-00031.

4.2. Equipamentos

A seguir estão detalhados os equipamentos utilizados:

- HPLC Shimadzu CBM-20A, com módulo dispensador de solvente LC-20AT, sistema degaseificador em linha DGU-20A5, detector UV-VIS com arranjo de diodo SPD-M20A e detector de índice de refração RID-10A, TAG HPL-00018, com calibração vigente até 05/2025.

- HPLC Shimadzu CBM-20A, com módulo dispensador de solvente LC-20AT, sistema degaseificador em linha DGU-20A5, detector UV-VIS com arranjo de diodo SPD-M20A, TAG HPL-00014, com calibração vigente até 05/2025.

- Balança analítica Mettler Toledo X 205 DU TAG BALFQ-01A, com calibração vigente até 05/2025.

4.3. Condições cromatográficas

- Equipamento: Cromatógrafo a líquido, com módulo controlador de sistema, sistema degaseificador em linha, módulo propulsor de solvente, injetor automático, forno de coluna e detector UV-VIS com arranjo de diodo;

- Volume de injeção: 50,0 µL;

- Fase Móvel: solução de Água:Acetonitrila (20:80 %v/v) durante os primeiros 4 minutos. A concentração de acetonitrila cai para 65% até 18 minutos. Retorna a concentração inicial, água:acetonitrila (20:80), até os 19 minutos. E, mantém a concentração por 5 minutos.

- Tempo de corrida: 24 minutos;

- Taxa de fluxo: 1,0 mL/min;

- Temperatura do forno: 50°C;

- Fase estacionária: coluna amino de cromatografia por interações hidrofílica (HILIC), 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5,0 µm, tamanho de poro de 70 Å;

- Comprimento de onda do detector: 190 nm.

4.4. Validação analítica

As análises para a validação analítica foram feitas no laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico – SCFQ da Funed. E a validação do método será realizada conforme recomendações dos documentos RDC 166/2017 e INMETRO-DOQ-CGCRE-008/2020. As figuras de mérito a serem avaliadas são: seletividade e limite de detecção.

4.4.1. Análises estatísticas e critérios de aceitação

As análises estatísticas foram realizadas por intermédio do software RTM, comumente utilizado para manipulação de dados.

Nas duas etapas da validação, foram realizados testes estatísticos buscando avaliar a presença de *outliers*, a normalidade e aleatoriedade dos dados. Para a análise de *outliers*, foi utilizado o teste de Grubbs, considerando a exclusão de no máximo 22% de valores aberrantes [41]. E, para verificação de normalidade dos dados o teste de Shapiro-Wilk foi escolhido, considerando um nível de significância de 0,05, nesse caso, a normalidade dos dados é obtida quando o Valor P é maior que 0,05. Por fim, para avaliação de aleatoriedade de dados o teste de Durbin-Watson, considerando que os dados são aleatórios quando o valor P é maior que 0,05, para o nível de confiança de 95%.

4.4.2. Seletividade

A finalidade do teste é avaliar a capacidade do método de identificar e quantificar a lactose monoidratada e verificar se seu tempo de retenção é reprodutível, mesmo na presença de substâncias estruturalmente similares, como a frutose, glicose e sacarose. O teste também avaliará matérias-primas de diferentes granulometrias, 200 mesh e spray dried.

Para avaliação da seletividade serão preparadas as soluções, em sextuplicata, expressas no Quadro 4.

Quadro 4 - Soluções utilizadas na seletividade

Solução	Concentração (mg mL ⁻¹)
Lactose monoidratada	1,5
Frutose	0,4
Glicose	1,0
Sacarose	1,0
Lactose monoidratada, Frutose, Glicose e Sacarose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0
Lactose monoidratada SD*, Frutose, Glicose e Sacarose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0
Lactose monoidratada 200 mesh*, Frutose, Glicose e Sacarose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0
Branco	-----

* Amostras produzidas a partir de matérias-primas.

O preparado das soluções dispostas no Quadro 4 é realizado em duas etapas. A primeira consiste no preparo das as soluções padrão estoque em sextuplicata, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Preparo de soluções estoque

Identificação	Substância	Massa (mg)	Volume (mL)	Concentração (mg mL ⁻¹)
A	Lactose monoidratada	50,00	10	5,00
B	Frutose	20,00	10	2,00
C	Glicose	35,00	10	3,50
D	Sacarose	52,00	10	5,20
E	Lactose monoidratada (SD)	125,00	25	5,00
F	Lactose monoidratada (200 mesh)	125,00	25	5,00

Para a realização da segunda etapa serão preparados 7 grupos de amostras. Nesse sentido, cada uma das sextuplicatas das soluções estoques dará origem a uma das 6 replicatas dentro de um grupo, dando origem a grupos de amostras independentes. Esse preparo é realizado conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Soluções finais para seletividade

Solução	Concentração (mg mL ⁻¹)	Volume A (mL)	Volume B (mL)	Volume C (mL)	Volume D (mL)	Volume E (mL)	Volume F (mL)	Volume Final (mL)
---------	-------------------------------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	-------------------

Lactose	1,5	3,00	----	-----	-----	-----	-----	10
Frutose	0,4	-----	2,00	-----	-----	-----	-----	10
Glicose	1,0	-----	-----	2,86	-----	-----	-----	10
Sacarose	1,0	-----	-----	-----	1,82	-----	-----	10
Lactose, frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0	3,00	2,00	2,86	1,82	-----	-----	10
Lactose SD, frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0	-----	2,00	2,86	1,82	3,00	-----	10
Lactose 200 mesh , frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0	-----	2,00	2,86	1,82	-----	3,00	10

Após as injeções de todos grupos de amostras independentes, em monoplicata, no cromatógrafo. Foram realizados os testes de *outliers*, Shapiro-Wilk e Durbin-Watson em todos os conjuntos de dados.

Em seguida, foi avaliado o desvio padrão relativo (DPR) para os tempos de retenção de cada uma das substâncias. Essa avaliação é feita com intuito de observar se os tempos de retenção para cada composto, submetidos às mesmas condições, são reprodutíveis. Os resultados do teste são considerados reprodutíveis quando nenhum conjunto de dados apresenta DPR superior a 2,0%.

A etapa posterior inclui aplicação dos testes F e testes T para avaliação de variâncias e médias entre os conjuntos, respectivamente. Conforme demonstrado no Quadro 5.

Quadro 5 – Testes de hipóteses aplicados na seletividade

Grupos Amostrais	Teste	Hipótese nula (H_0)	Hipótese alternativa (H_1)
Relação entre as áreas obtidas para a solução de padrão de lactose monoidratada e as obtida para a lactose na solução padrão combinada	F	A presença de outros compostos não afeta a variância das áreas da lactose	A presença de outros compostos afeta a variância das áreas da lactose
	T	A presença de outros compostos não afeta a média das áreas da lactose	A presença de outros compostos afeta a variância das áreas da lactose
Relação entre as áreas para a solução padrão de lactose monoidratada e as obtidas para a lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> na solução combinada	F	Esta granulometria da amostra não afeta a variância das áreas da lactose entre os grupos	Esta granulometria da amostra afeta a variância das áreas da lactose entre os grupos
	T	Esta granulometria da amostra não afeta a média das áreas da lactose entre os grupos	Esta granulometria da amostra afeta a média das áreas da lactose entre os grupos
Relação entre as áreas obtidas para a solução padrão de lactose monoidratada e as obtidas para a lactose monoidratada 200 mesh na solução combinada	F	Esta granulometria da amostra não afeta a variância das áreas da lactose entre os grupos	Esta granulometria da amostra afeta a variância das áreas da lactose entre os grupos
	T	Esta granulometria da amostra não afeta a média das áreas da lactose entre os grupos	Esta granulometria da amostra afeta a média das áreas da lactose entre os grupos

Todos os testes são realizados considerando um nível de confiança de 95%, ou seja, α igual a 0,05. Neste caso, a hipótese nula será aceita quando o valor P for maior que

0,05 e rejeitada quando o valor P for menor que o nível de significância, aceitando a hipótese alternativa.

Por fim, como se trata de um método cromatográfico, será avaliado a pureza de pico. Neste teste, os picos identificados para a lactose monoidratada e os compostos de estruturas similares devem apresentar pureza de pico igual ou superior a 95% (ou 0,95).

4.4.3. Limite de Detecção

Para calcular o limite de detecção (LD) da lactose monoidratada, glicose, frutose e sacarose, será utilizado o método de avaliações/percepções visuais das soluções padrão de Lactose monoidratada, glicose, frutose e sacarose. A avaliação do limite de detecção será realizada por meio da percepção do sinal cromatográfico atrelado à variação da concentração dos analitos. E será avaliada a menor concentração necessária em que os analitos podem ser visualizados com segurança [16, 17].

Serão preparadas soluções combinadas de padrão de lactose monoidratada com frutose, sacarose e glicose, em três concentrações distintas para avaliar o limite de detecção de cada uma das substâncias. Conforme concentrações dispostas no Quadro 6.

Quadro 6 – Soluções para teste de limite de detecção

Identificação	Lactose monoidratada (mg mL ⁻¹)	Sacarose (mg mL ⁻¹)	Glicose (mg mL ⁻¹)	Frutose (mg mL ⁻¹)
1	1,5	1,0	1,0	0,4
2*	1,5	0,4	0,4	0,16
3*	1,5	0,2	0,2	0,08
4**	0,6	0,4	0,4	0,16
5**	0,3	0,2	0,2	0,08

*As soluções padrão identificadas como 2 e 3 possuem concentração de lactose constante.

** As soluções padrão identificadas como 4 e 5 possuem a concentração de lactose variável.

As soluções estoques expressas na Tabela 1, do item 4.4.2 são utilizadas no preparo da solução de maior nível de concentração, identificado como 1. Todos os grupos são compostos por sextuplicatas independentes, injetados em monoplicata no cromatógrafo. A Tabela 3 é detalha o preparo das soluções.

Tabela 3 – Preparo de soluções para limite de detecção

Identificação	Solução	Concentração (mg mL ⁻¹)	Volume A (mL)	Volume B (mL)	Volume C (mL)	Volume D (mL)	Volume Final (mL)
1	Lactose monoidratada, frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,4, 1,0 e 1,0	3,00	2,00	2,86	1,82	10
2	Lactose monoidratada (cte), frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,16, 0,4, 0,4	1,50	0,400	0,571	0,364	5
3	Lactose monoidratada (cte), frutose, sacarose e glicose	1,5, 0,08, 0,2, 0,2	1,50	0,200	0,286	0,182	5

(cte): indica que a concentração da lactose monoidratada é constante.

Outros dois níveis de solução combinada serão preparadas utilizando as soluções identificadas como 1. Estas soluções variam também a concentração da lactose monoidratada, e assim, será possível avaliar seu próprio limite de detecção, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Preparo de soluções para limite de detecção

Identificação	Solução	Concentração (mg mL ⁻¹)	Volume de 1 (mL)	Volume Final (mL)
4	Lactose monoidratada, frutose, sacarose e glicose	0,6, 0,16, 0,4, 0,4	2,00	5
5	Lactose monoidratada, frutose, sacarose e glicose	0,3, 0,08, 0,2, 0,2	1,00	5

Devem ser observados sinais cromatográficos referente aos quatro compostos em cada uma das 6 replicatas dentro de um grupo. Caso algum dos compostos não seja detectado em alguma replicata, o LD dever ser reavaliado, considerando o limite em que a visualização foi mais segura. O limite de detecção será determinado como a média das concentrações reais de cada analito, excluindo-se *outliers*.

5. RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1. Desenvolvimento do método

A fase estacionária escolhida para o desenvolvimento do método é composta é caracterizada como coluna amino de cromatografia por interações hidrofílica (HILIC), com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5,0 μm e tamanho de poro de 70 Å. Isto porque, as interações de ligação de hidrogênio entre os grupos amino e os grupos hidroxila dos açúcares melhoram a retenção e a separação dos compostos [9, 11, 26, 30, 32, 33, 42].

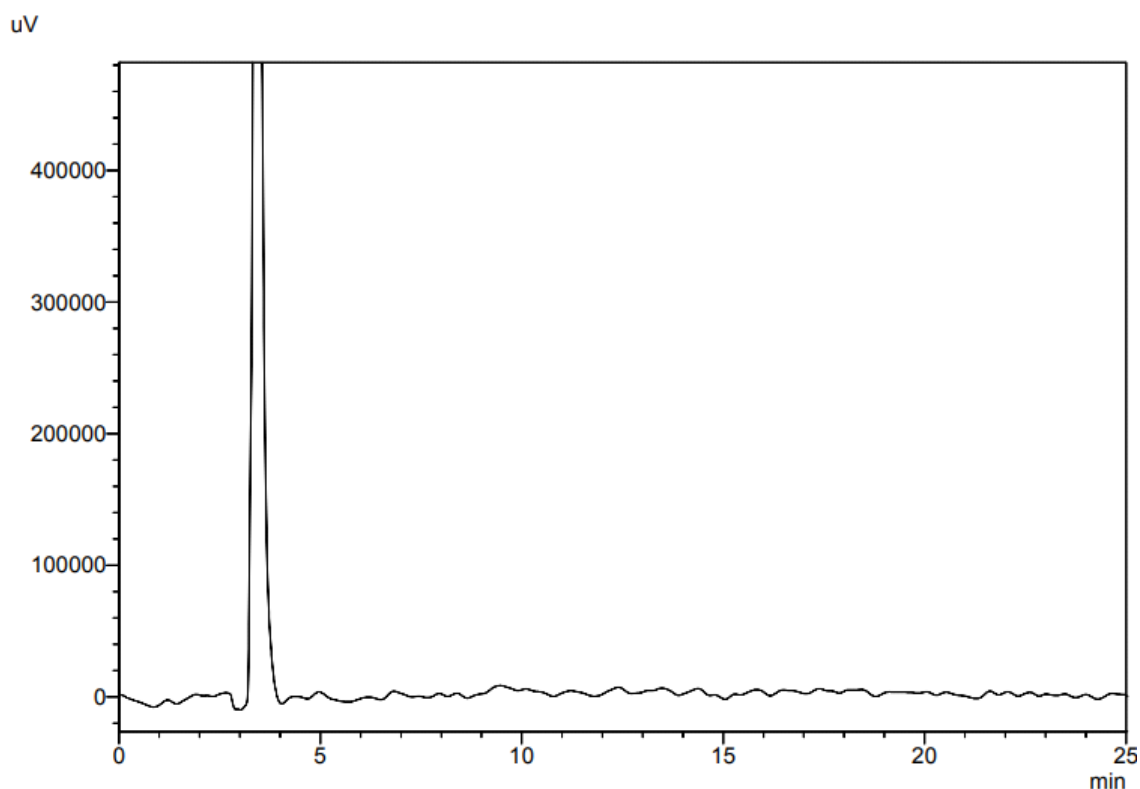
A presença de grupos hidroxila nas estruturas dos açúcares confere a esses compostos uma alta afinidade por solventes polares. Nesse contexto, a eficiência da eluição dos carboidratos aumenta conforme a polaridade do solvente se intensifica. No entanto, o uso de altas concentrações de água resulta na diminuição na resolução do cromatograma. Em vista disso, a fase móvel normalmente é composta por acetonitrila e água, com a acetonitrila variando de 70% a 85% e a água de 30% a 15% em termos de proporção v/v [11, 29, 30, 31, 32, 33].

Optou-se por iniciar os testes utilizando os detectores RID e DAD de forma simultânea, para avaliar posteriormente qual é o mais adequado. Na utilização dos dois detectores em conjunto é necessário que a concentração da fase móvel seja constante. E, as condições cromatográficas definidas foram as seguintes:

- Fase Móvel: solução de Água:Acetonitrila (25:75 %v/v).
- Tempo de corrida: 20 minutos;
- Taxa de fluxo: 1,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 45°C;
- Comprimento de onda do detector: 190-400 nm.
- Volume de injeção: 50,0 μL .

A Figura 6 demonstra um cromatograma obtido pela utilização do detector RID.

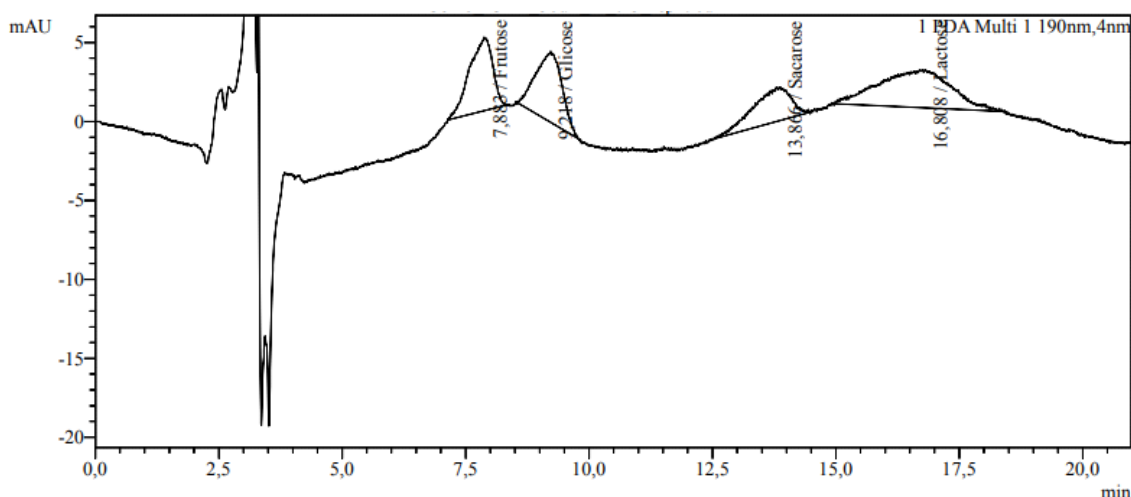
Figura 6 – Cromatograma obtido no RID



É notável que existe apenas um pico correspondente ao solvente, entre 3 e 4 minutos. Neste caso, o RID não foi capaz de detectar a lactose e os outros compostos nas concentrações de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de frutose, $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de sacarose, $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de glicose e $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de lactose. Para que as substâncias fossem detectadas de forma segura seria necessário aumentar as concentrações dos padrões. O que não é interessante, já que elevaria o consumo dos padrões de lactose monoidratada, glicose, sacarose e frutose.

A Figura 7 demonstra um cromatograma obtido simultaneamente pelo detector DAD.

Figura 7 – Cromatograma gerado pelo DAD no método isocrático



Foi observado que os dois picos, correspondentes a frutose (7,883 min) e a glicose (9,218 min), sofreram uma leve sobreposição. Já os picos correspondentes a sacarose (13,866 min) e a lactose (16,808 min), respectivamente, sofrem com alargamentos de banda causados pelos maiores tempos de retenção dos compostos na coluna.

O segundo método proposto por Jalaludin e Kim (2021) foi testado. Nele, apenas o detector UV é utilizado, a fase móvel é composta de 35% de água e 65% de acetonitrila nos primeiros 4 minutos e, no tempo de 4 a 10 minutos, a concentração da água foi decaindo para 20% enquanto a acetonitrila se tornava 80% da composição da fase móvel, mantendo o fluxo e a coluna utilizados no primeiro método. Portanto, foram definidas as seguintes condições instrumentais:

- Fase Móvel: solução de Água:Acetonitrila (35:65 %v/v) durante os primeiros 4 minutos. A concentração de acetonitrila aumenta para 80% até 10 minutos. Concentração final de Água:Acetonitrila (20:80 %v/v).

Tempo de corrida: 10 minutos;

- Taxa de fluxo: 1,0 mL/min;

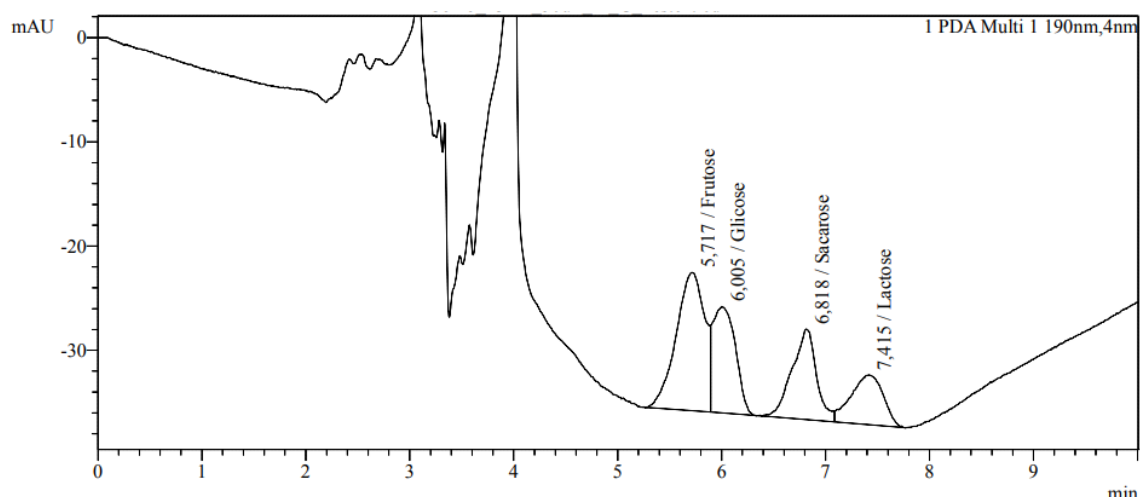
- Temperatura do forno: 50°C;

- Comprimento de onda do detector: 190-400 nm;

- Volume de injeção: 50,0 µL.

Entretanto o teste não é específico para identificação de lactose. Tendo sido criado para quantificação de compostos similares, como frutose, glicose, sacarose e maltose (Jalaludin; Kim, 2021). Na Figura 8 é demonstrado o cromatograma obtido nessas condições para a lactose monoidratada, glicose, sacarose e frutose.

Figura 8 – Método em gradiente



O resultado obtido no segundo método também não foi satisfatório. Já que os picos iniciais, correspondentes a frutose e a glicose, ficam sobrepostos. E os dois últimos, que representam a sacarose e a lactose, respectivamente, sofreram leve sobreposição. Optou-se pela alteração do método para as seguintes condições:

- Fase Móvel: solução de Água:Acetonitrila (20:80 %v/v) durante os primeiros 4 minutos. A concentração de acetonitrila cai para 65% até 18 minutos. Retorna a concentração inicial, água:acetonitrila (20:80), até os 23 minutos. E, mantém a concentração por 5 minutos.

- Tempo de corrida: 28 minutos;
- Taxa de fluxo: 1,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 50°C;
- Comprimento de onda do detector: 190 nm.
- Volume de injeção: 50,0 µL.

Conforme pode ser observado nos cromatogramas 7 e 8 a frutose é mesmo polar que a glicose e estes monossacarídeos, são menos polares que os dissacarídeos, sacarose e lactose, respectivamente. Isso porque, os monossacarídeos possuem estruturas menores e menor número de grupos polares que diminuem sua interação com a coluna, esses compostos são mais facilmente carreados pela coluna. Portanto, para favorecer a separação desses compostos a fase móvel no início da corrida é mais apolar, pelo incremento da concentração de acetonitrila. Após a separação dos monossacarídeos, a concentração de água aumenta, tornando a fase móvel mais polar. Isso é justificado pois a fase móvel polar favorece o deslocamento da sacarose e da lactose monoidratada. E ao

final, a concentração inicial da fase móvel é retomada para estabilização da coluna para a próxima injeção.

Os resultados obtidos indicam que o método é capaz de separar a lactose de estruturas similares como a frutose, glicose e sacarose. Como pode ser visto nos cromatogramas representado pela Figura 9 e 10, da solução combinada e da solução padrão de lactose.

Figura 9 – Cromatograma da solução combinada

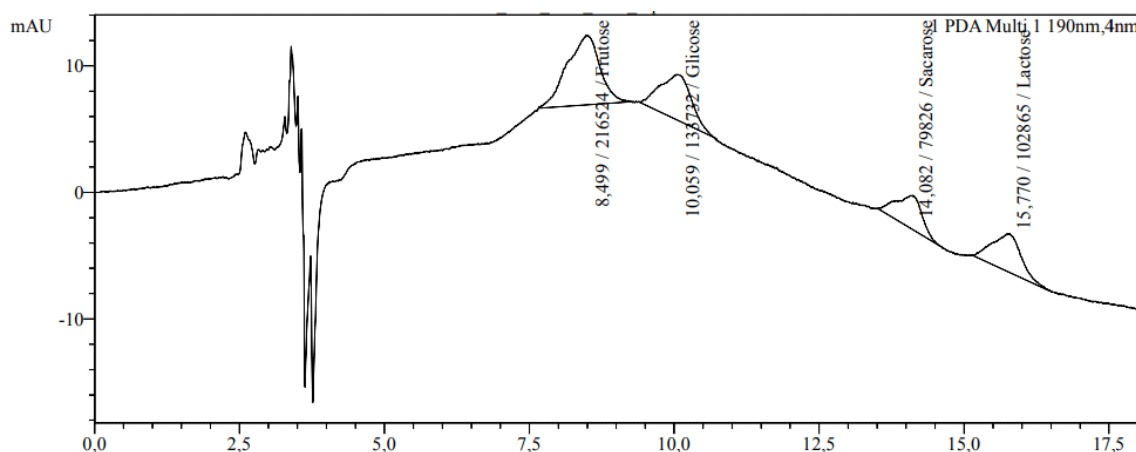
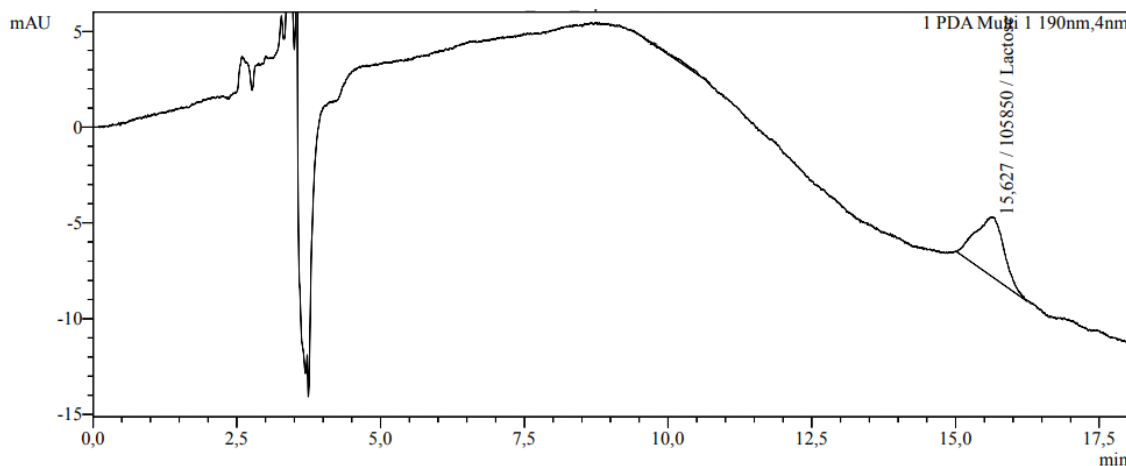


Figura 10 – Cromatograma da lactose



Nos cromatogramas representados nas Figuras 9 e 10, foi possível detectar os picos da frutose, glicose, sacarose e lactose, em concentrações de $0,41 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,01 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,99 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,52 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. A detecção por UV, para o método em gradiente de fase móvel, apresentou vantagens que incluem a diminuição do alargamento dos picos referentes à sacarose e à lactose. Além, de demonstrar capacidade de separar os monossacarídeos, frutose e glicose.

Por fim, com objetivo de melhorar o tempo de corrida, foram realizados testes para diminuir o tempo de estabilização final da coluna para a próxima injeção. Essa estabilização era realizada em duas etapas, primeiro a concentração de acetonitrila aumenta no período de 18 a 23 minutos até a concentração inicial da corrida, acetonitrila:água (80:20). Em seguida, a concentração era mantida por 5 minutos, totalizando 28 minutos. A alteração do método tem foco na primeira etapa, variando a taxa em que a concentração de acetonitrila atinge 80% da composição da fase móvel. Portanto, o método foi alterado para atingir as concentrações iniciais de fase móvel no período de 18 a 19 minutos e manter essa concentração durante cinco minutos, totalizando 24 minutos de corrida. Visto isso, o método final desenvolvido é detalhado no Quadro 7.

Quadro 7 – Condições finais do método

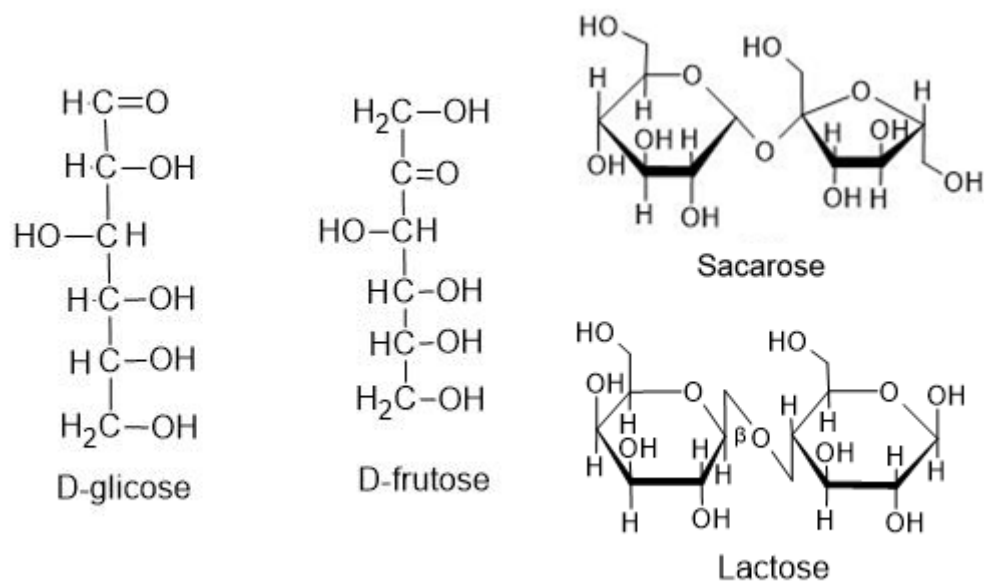
Parâmetros	Condições
Equipamento	Cromatógrafo a líquido, com módulo controlador de sistema, sistema degaseificador em linha, módulo propulsor de solvente, injetor automático, forno de coluna, detector UV-VIS
Comprimento de onda do detector	190 nm
Taxa de Fluxo	1,0 mL/min
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrila (20:80 %v/v) nos primeiros 4 minutos. A concentração muda para Água:Acetonitrila (35:65 %v/v) até 18 minutos. Retorna a concentração inicial, água:acetonitrila (20:80), até os 19 minutos e se mantém nessa concentração até os 24 minutos.
Tempo de Corrida	24 minutos
Composição fase estacionária	Coluna amino, com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5,0 µm e tamanho de poro de 70 Å.
Temperatura do forno	50 °C
Volume de Injeção	50,00 µL

5.2. Validação analítica

5.2.1. Seletividade

A finalidade do teste é avaliar a capacidade do método de identificar e quantificar a lactose monoidratada e verificar se seu tempo de retenção é reprodutível, mesmo na presença de substâncias estruturalmente similares, como a frutose, glicose e sacarose. As estruturas de cada um dos compostos é disposto na Figura 11.

Figura 11 – Estruturas da frutose, glicose, sacarose e lactose. Estruturas feitas no software ChemSketch®.



De fato, a lactose monoidratada, a frutose, a glicose e a sacarose possuem estruturas químicas similares, que conferem aos compostos características parecidas. Essa semelhança, indica que a separação desses compostos em métodos cromatográficos pode ser desafiadora. Nesse caso, a capacidade do método de separá-las é um indicativo de seletividade. Ou seja, mesmo quando os compostos possuem similaridade, o método é capaz de diferenciá-las.

Durante o preparo das amostras, percebeu-se que não havia solução estoque de glicose $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ suficiente para o preparo das amostras de lactose monoidratada 200 mesh combinadas. Visto, isso foram realizados cálculos com o quantitativo restante de padrões para preparo das amostras. O preparo de cada um das sextuplicatas foi realizado adicionando $0,320 \text{ mL}$ de frutose $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,457 \text{ mL}$ de glicose $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,308 \text{ mL}$ de sacarose $5,2 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,480 \text{ mL}$ de lactose monoidratada 200 mesh $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,035 \text{ mL}$ de água purificada. Os volumes foram ajustados conforme massas reais dos padrões utilizados.

Na tabela 5 foram sistematizadas as informações referentes a cada injeção realizada para a etapa de seletividade. Estão indicados os compostos avaliados, a replicata analisada, o tempo de retenção de cada substância e as áreas de cada pico.

Tabela 5 – Dados experimentais sistematizados

Amostras	Composto	Replicata	Tempo de Retenção (min)	Área (u.a)
Padrão de Frutose	Frutose	1	8,106	172277
Padrão de Frutose	Frutose	2	8,095	183915
Padrão de Frutose	Frutose	3	8,099	213285
Padrão de Frutose	Frutose	4	8,09	216374
Padrão de Frutose	Frutose	5	8,055	190020
Padrão de Frutose	Frutose	6	8,08	226537
Padrão de Glicose	Glicose	1	9,57	141102
Padrão de Glicose	Glicose	2	9,506	132268
Padrão de Glicose	Glicose	3	9,533	160513
Padrão de Glicose	Glicose	4	9,504	152512
Padrão de Glicose	Glicose	5	9,502	112812
Padrão de Glicose	Glicose	6	9,415	117659
Padrão de Sacarose	Sacarose	1	13,356	96582
Padrão de Sacarose	Sacarose	2	13,362	92005
Padrão de Sacarose	Sacarose	3	13,315	79645
Padrão de Sacarose	Sacarose	4	13,282	86718
Padrão de Sacarose	Sacarose	5	13,296	99007
Padrão de Sacarose	Sacarose	6	13,278	81218
Padrão de Lactose	Lactose	1	14,899	89615
Padrão de Lactose	Lactose	2	14,898	114674
Padrão de Lactose	Lactose	3	14,882	104131
Padrão de Lactose	Lactose	4	14,834	88522
Padrão de Lactose	Lactose	5	14,85	112905
Padrão de Lactose	Lactose	6	14,829	97905
Padrão combinado	Frutose	1	7,902	219416
	Glicose		9,338	118533
	Sacarose		13,18	94876
	Lactose		14,804	113798
Padrão combinado	Frutose	2	7,863	220231
	Glicose		9,279	105276
	Sacarose		13,171	97278
	Lactose		14,814	114988
Padrão combinado	Frutose	3	7,897	210262
	Glicose		9,261	136838
	Sacarose		13,037	81147
	Lactose		14,779	102676
Padrão combinado	Frutose	4	7,89	213574
	Glicose		9,288	119471
	Sacarose		13,037	94287
	Lactose		14,742	118681
Padrão combinado	Frutose	5	7,858	215904
	Glicose		9,226	122440
	Sacarose		13,109	86347
	Lactose		14,753	106541
Padrão combinado	Frutose	6	7,878	207583
	Glicose		9,26	115984
	Sacarose		13,037	82663
	Lactose		14,73	94383

Continua

Tabela 5 - Dados experimentais sistematizados

Continuação

Amostras	Composto	Replicata	Tempo de Retenção (min)	Área (u.a)
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	1	7,861	202379
	Glicose		9,251	114255
	Sacarose		13,037	87513
	Lactose		14,717	124112
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	2	7,855	213045
	Glicose		9,201	126363
	Sacarose		13,036	72740
	Lactose		14,706	113057
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	3	7,856	194783
	Glicose		9,24	119727
	Sacarose		13,053	83053
	Lactose		14,687	104652
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	4	7,834	208404
	Glicose		9,167	114146
	Sacarose		13,042	85583
	Lactose		14,669	113820
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	5	7,821	211254
	Glicose		9,244	120476
	Sacarose		13,001	78595
	Lactose		14,625	103317
Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i> combinada	Frutose	6	7,813	206484
	Glicose		9,212	115172
	Sacarose		13,008	76232
	Lactose		14,638	123042
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	1	7,581	193584
	Glicose		8,888	144011
	Sacarose		12,363	147706
	Lactose		14,17	101821
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	2	7,574	192054
	Glicose		8,888	144151
	Sacarose		12,527	123925
	Lactose		14,168	93763
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	3	7,576	197231
	Glicose		8,872	143458
	Sacarose		12,494	135624
	Lactose		14,167	100039
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	4	7,563	196911
	Glicose		8,888	145799
	Sacarose		12,464	127878
	Lactose		14,152	84182
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	5	7,558	203266
	Glicose		8,888	143133
	Sacarose		12,488	112641
	Lactose		14,125	93763
Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> combinada	Frutose	6	7,543	195025
	Glicose		8,872	143120
	Sacarose		12,46	116007
	Lactose		14,121	98956

Conforme dados da Tabela 5, foram realizados os testes de Grubbs para avaliação de *outliers*. Os p-valores obtidos para todos os grupos foram superiores a 0,05. Exceto, para a área da glicose, correspondente a 4ª replicata da Lactose

monoidratada 200 mesh combinada. Esse valor foi excluído para posteriores testes de normalidade e aleatoriedade.

Os testes de Shapiro-Wilk para verificar normalidade e Durbin-Watson para avaliar aleatoriedade, foram organizados na Tabela 6, assim como o grupo avaliado e os p-valores associados.

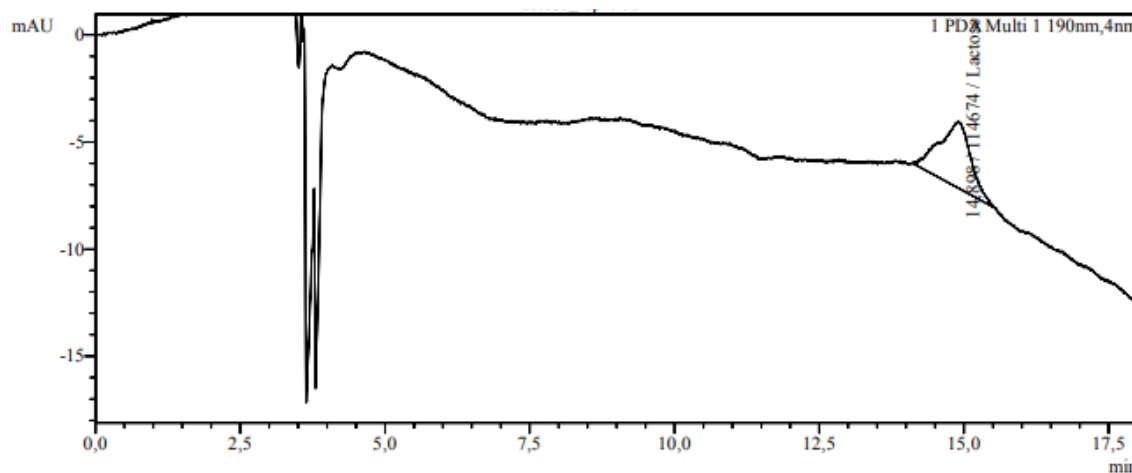
Tabela 6 – Valores P para testes de Shapiro-Wilk e Durbin-Watson

Grupo	Composto	Valores P	
		Shapiro-Wilk	Durbin-Watson
Padrão de Lactose	Lactose	0,390	0,737
Padrão de Frutose	Frutose	0,598	0,452
Padrão de Glicose	Glicose	0,750	0,184
Padrão de Sacarose	Sacarose	0,568	0,420
Padrão Combinado	Frutose	0,715	0,665
	Glicose	0,649	0,788
	Sacarose	0,711	0,936
	Lactose	0,711	0,554
Combinado com Lactose monoidratada <i>Spray Dried</i>	Frutose	0,609	0,876
	Glicose	0,222	0,619
	Sacarose	0,823	0,554
	Lactose	0,355	0,285
Combinado com Lactose monoidratada 200 mesh	Frutose	0,497	0,613
	Glicose	0,222	0,681
	Sacarose	0,823	0,821
	Lactose	0,319	0,501

Conforme apresentado na Tabela 6, todos os p-valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk e no teste de Durbin-Watson foram maiores que 0,05. Ou seja, com 95% de confiança é possível aceitar as hipóteses nulas de que os dados seguem distribuições normais e são aleatórios, respectivamente.

O cromatograma a seguir corresponde ao padrão de lactose monoidratada, como representado na Figura 12.

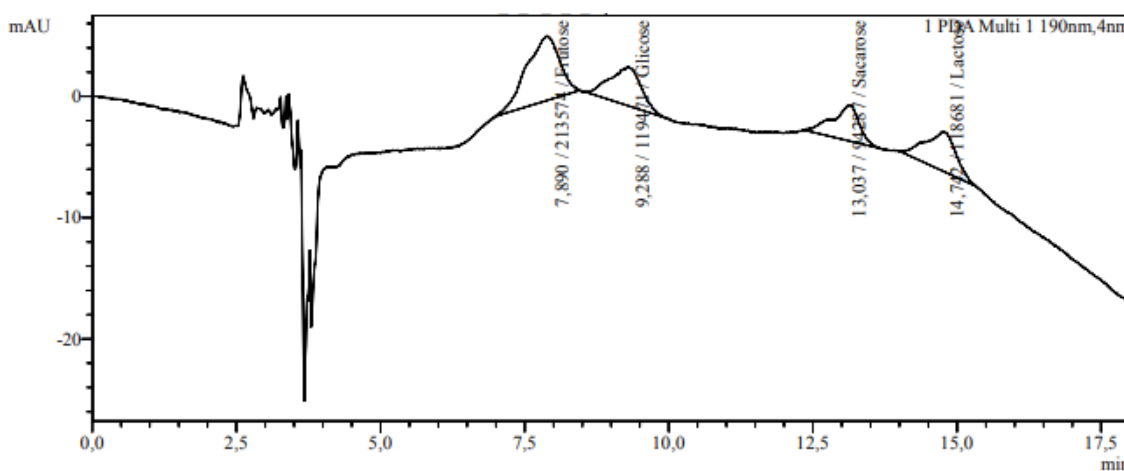
Figura 12 – Cromatograma do padrão de lactose monoidratada



O cromatograma demonstrado na Figura 12 é correspondente a uma das injeções do padrão de lactose em concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Em relação ao formato do pico, o fator de assimetria de pico, ou *Tailing Factor*, deve estar compreendido entre 0,8 e 1,8 [43]. Neste caso, como o *Tailing Factor* obtido foi igual a 0,897, conclui-se que sua simetria é satisfatória. Por fim, a pureza de pico obtida para a lactose foi igual a 99,96%, que indica ausência de detecção de impurezas nos picos da lactose.

O cromatograma representado pela Figura 13, foi obtido a partir da injeção de padrão combinado contendo lactose monoidratada, frutose, glicose e sacarose.

Figura 13 – Cromatograma do padrão combinado



O cromatograma é referente as injeções de frutose $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, glicose $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, sacarose $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e lactose monoidratada $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Em relação a pureza de pico nas 6 injeções referentes ao padrão combinado, foi obtido 99,98% para a lactose monoidratada, 99,99% para a frutose, 99,97% para a glicose e 99,98% para a sacarose, demonstrando que as substâncias não sofrem interferências umas das outras.

Em seguida, foi realizada a avaliação das resoluções dos cromatogramas dos padrões combinados. Para a glicose, a resolução obtida foi de 1,252, em relação ao pico da frutose, o que indica que a separação foi satisfatória. A resolução obtida para a sacarose em relação a glicose foi de 3,959, indicando que os picos estão muito afastados. Já a resolução obtida para a lactose em relação a sacarose foi de 1,691, o que indica que os picos estão bem resolvidos e não sofrem sobreposições.

Os padrões individuais e os padrões combinados preparados em sextuplicatas independentes, originaram 12 picos relacionados a cada um dos quatro compostos. A tabela 7 demonstra os resultados obtidos para os desvios padrão relativos do tempo de retenção de cada composto.

Tabela 7 – Tempos de retenção e desvios padrão relativos para cada composto

Substância	Tempo de retenção médio (min)	Desvio Padrão	Desvio padrão relativo (DPR, %)
Frutose	7,98	0,109	1,37
Glicose	9,39	0,127	1,36
Sacarose	13,2	0,126	0,955
Lactose	14,8	0,0587	0,396

O tempo de retenção médio obtido para o pico lactose monoidratada em todas as injeções foi equivalente a 14,8 minutos, com desvio padrão relativo igual a 0,396%. Para a frutose, glicose e sacarose, os resultados obtidos para o desvio padrão relativo foram 1,37%, 1,36% e 0,955%, respectivamente. Logo, pode-se concluir que os tempos de retenção para cada composto é considerado reprodutível, uma vez que, demonstraram variações inferiores a 2%, limite estabelecido previamente.

Como critério de seletividade do método, foi avaliado se a lactose monoidratada pode ser identificada e quantificada na presença de outras substâncias, com características similares a ela. Pensando nisso, avaliou-se o desvio padrão relativo dos grupos de amostras de lactose *spray dried* e 200 *mesh*, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Tabela de Desvio Padrão Relativo para amostras

Amostra	Substância	Tempo de retenção médio (min)	Desvio Padrão	Desvio padrão relativo (DPR, %)
Lactose <i>Spray Dried</i>	Frutose	7,84	0,0202	0,258
	Glicose	9,22	0,0321	0,349
	Sacarose	13,0	0,0204	0,157
Lactose 200 <i>mesh</i>	Lactose	14,7	0,0368	0,251
	Frutose	7,57	0,0141	0,186
	Glicose	8,88	0,00826	0,0930
	Sacarose	12,5	0,0559	0,449
Combinada	Lactose	14,2	0,0223	0,157

Os resultados de DPR obtidos para cada composto analisado em sextuplicata foram abaixo de 2%, demonstrando que as amostras de granulometrias diferentes apresentam tempo de retenção dos compostos com pouca variabilidade.

Para análise entre grupos, foi realizado teste F para verificar se a variância da área obtida nas 6 injeções de padrão de lactose monoidratada é equivalente a variância da área da lactose monoidratadas nas 6 injeções de padrões combinados. Em seguida, o teste t foi realizado para comparação das médias entre as áreas nesses dois grupos. De forma semelhante, foi realizado teste F e teste t para comparação dos resultados obtidos

para as amostras de lactose monoidratada *spray dried* combinadas e lactose monoidratada 200 *mesh*. Os resultados foram sistematizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação de variâncias e médias entre áreas de lactose monoidratada

Grupo 1	Grupo 2	P-Valor	
		Teste F	Teste T
Padrão de lactose monoidratada	Padrão de lactose monoidratada com frutose, glicose e sacarose	0.6469792	0.24904151
Padrão de lactose monoidratada	Lactose monoidratada <i>spray dried</i> com frutose, glicose e sacarose	0.6001773	0.05965897
Padrão de lactose monoidratada	Lactose monoidratada 200 <i>mesh</i> com frutose, glicose e sacarose	0.2446269	0.29301262

A partir dos resultados dispostos na Tabela 9, pode-se observar que o p-valor obtido para o teste F, na análise de variâncias entre as áreas de padrão de lactose monoidratada e padrão de lactose monoidratada contendo outros compostos, foi equivalente a 0,647 e este valor é maior que o nível de significância 0,05. Logo, aceita-se a hipótese nula de que as variâncias são equivalentes e a presença de outros compostos não altera a variabilidade dos resultados obtidos para a área da lactose monoidratada. De forma semelhante, o p-valor obtido através do teste T, equivalente a 0,249, é superior a 0,05, indicando que a hipótese nula é aceita e a presença da frutose, sacarose e glicose não alteram a média das áreas obtidas para a lactose monoidratada.

Em seguida, foi avaliado se a diferença das granulometrias das matérias-primas analisadas pode alterar a percepção do analito. Para isso, foram realizados testes F e T fixando um dos grupos como o padrão de lactose monoidratada e contrastando-o com dois outros grupos. O primeiro grupo é referente às áreas obtidas para a lactose monoidratada na matéria-prima *Spray Dried* e, o segundo grupo, os resultados obtidos para a lactose monoidratada na matéria-prima 200 *mesh*. Na primeira comparação, o p-valor foi 0,600 para o teste F, indicando que as variâncias são equivalentes. E, para o teste T, o p-valor foi equivalente a 0,060 indicando que a média das áreas entre os grupos é semelhante. Já na segunda comparação, o p-valor obtido no teste F é 0,245, o que indica variâncias equivalentes entre os grupos. E, o p-valor encontrado no teste T foi 0,293, ou seja, a média das áreas entre os grupos é semelhante. Portanto, aceitam-se as hipóteses nulas para os dois casos, nos testes T e nos testes F. Isso indica que as variâncias e as médias, obtidas como resposta ao analito, não são afetadas pela diferença da granulometria das amostras.

Conclui-se que o método é considerado seletivo. Isto porque, foi observado que compostos com funções orgânicas e estruturas similares à lactose, quando submetidos

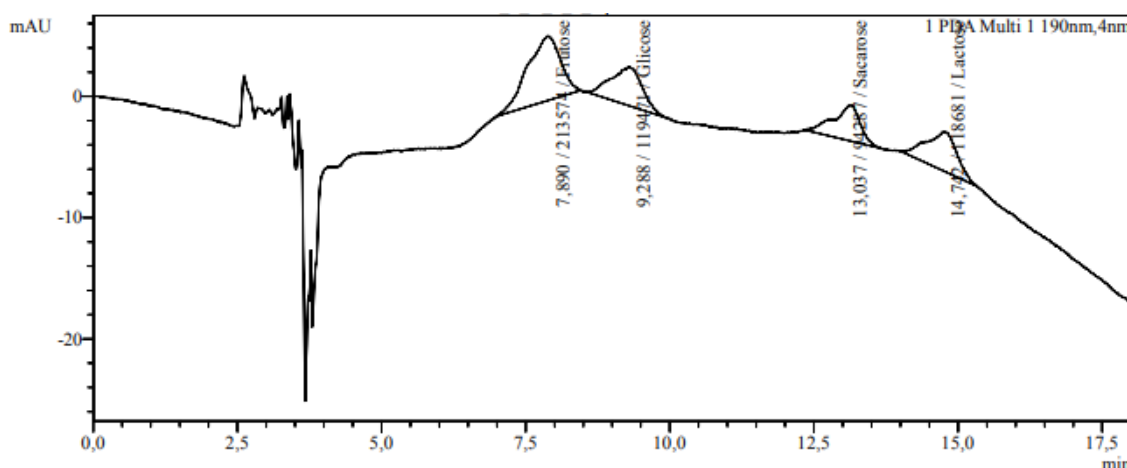
ao método aqui proposto, não são capazes de alterar a resposta ao analito. E, que diferentes granulometrias da matéria-prima não alteram a resposta do método a presença de lactose monoidratada.

5.2.2. Limite de Detecção

O limite de detecção da lactose monoidratada, glicose, frutose e sacarose, foi obtido através de avaliações visuais dos cromatogramas obtidos para as soluções padrão de lactose monoidratada, glicose, frutose e sacarose preparadas em sextuplicatas e em 5 diferentes concentrações, conforme disposto no Quadro 6 (item 4.3.3).

As amostras identificadas como 1, sendo as mais concentradas deram origem ao cromatograma da Figura 14.

Figura 14 – Cromatograma grupo 1 para determinação do limite de detecção

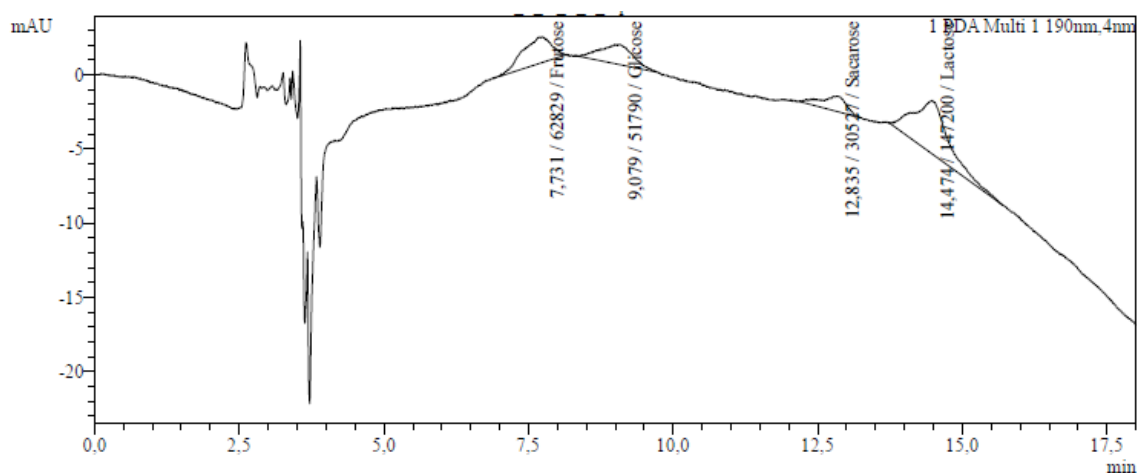


Através da análise visual, foi possível observar que os picos correspondentes aos quatro compostos podem ser visualizados com clareza e segurança. Nos testes de Grubbs, para verificação de outliers, não foram identificados outliers relacionados aos tempos de retenção dos picos. Portanto, nenhum valor foi excluído.

No teste de identificação de lactose monoidratada por CCD todos os padrões estão em concentrações de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Já no teste proposto por este trabalho a concentração de lactose monoidratada é igual a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Portanto, a concentração de lactose monoidratada utilizada neste método é três vezes mais elevada que no método por CCD. Em vista disso, foi avaliado se em concentrações de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ o sinal correspondente à lactose monoidratada interfere na detecção dos outros compostos. Para isso, foi injetado as amostras identificadas como 2 e 3.

O grupo 2 gerou o cromatograma representado pela Figura 15.

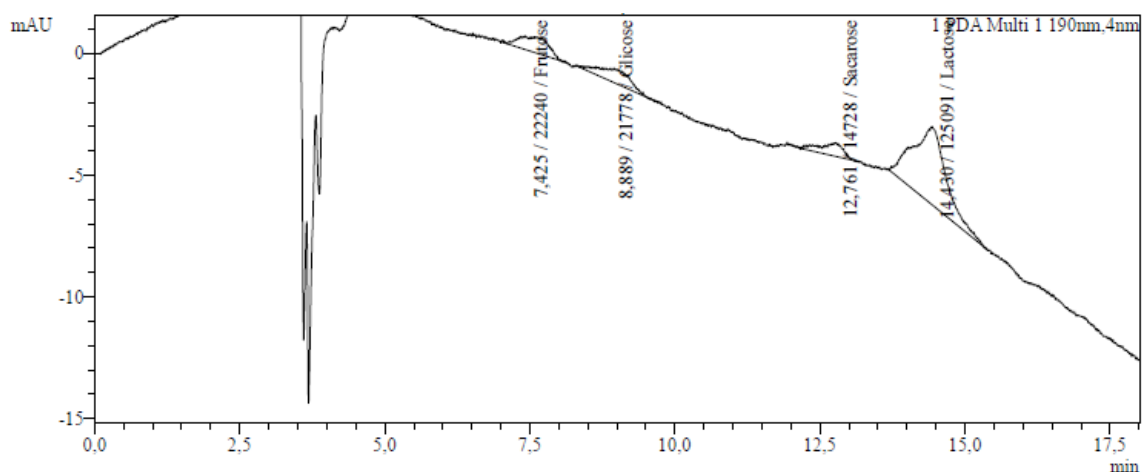
Figura 15 - Cromatograma grupo 2 para determinação do limite de detecção



No cromatograma é possível notar que o pico da lactose monoidratada a concentrações de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ não afeta a visualização do pico da frutose a $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, da glicose a $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ e da sacarose a $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Em uma das replicatas não foi possível identificar pico correspondente a frutose. Portanto, o valor de tempo de retenção foi considerado 0 e seus dados foram excluídos como *outlier*. Esse resultado foi observado devido a um erro óbvio no preparo dos padrões, foi observado que o padrão de frutose não foi adicionado na replicata e devido a isso não foi possível verificar a presença do pico.

A Figura 16, demonstra o cromatograma para as concentrações definidas no nível 3.

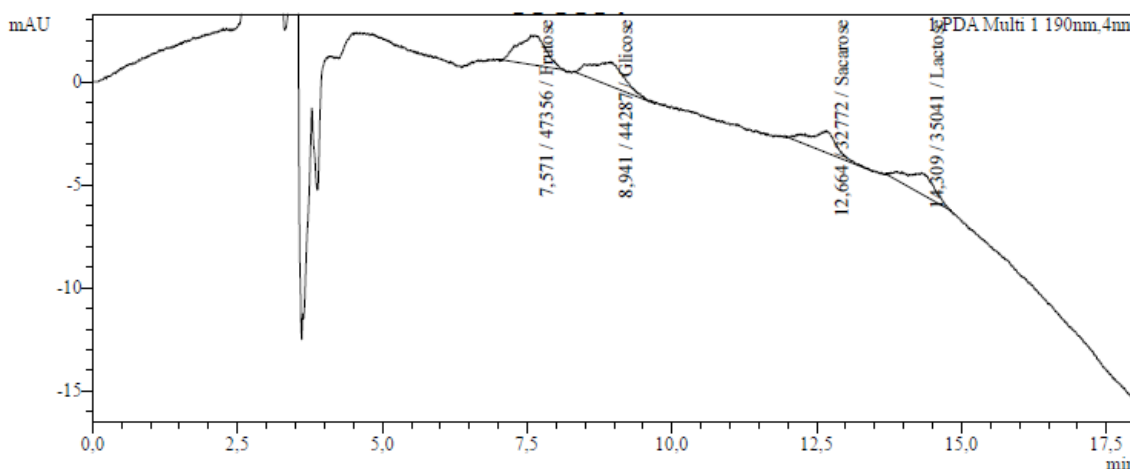
Figura 16 – Cromatograma grupo 3 para determinação do limite de detecção



Nota-se que a concentração de lactose monoidratada $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ não afeta os picos referentes as concentrações de frutose $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, sacarose $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e glicose $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

A Figura 17, representa o cromatograma obtido para as injeções identificadas pelo número 4.

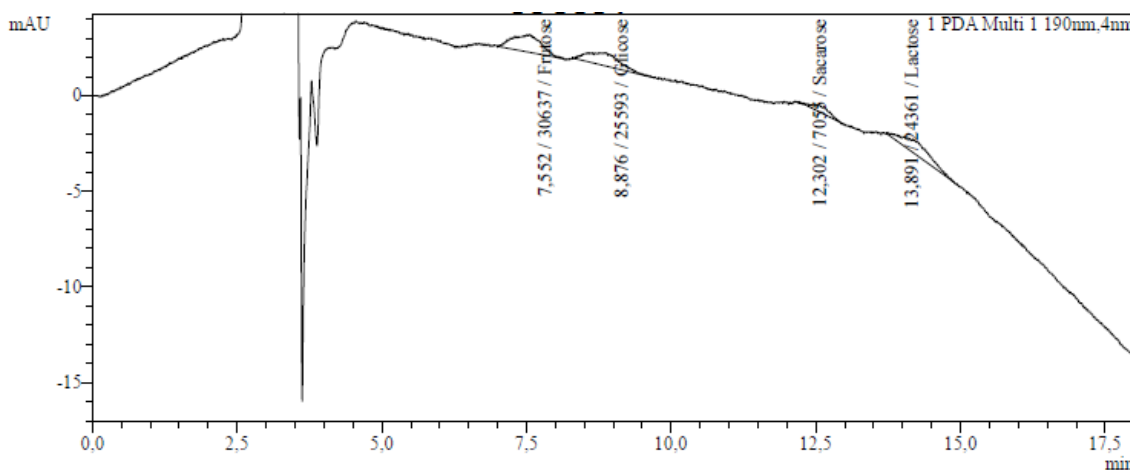
Figura 17 – Cromatograma grupo 4 para determinação do limite de detecção



Através da Figura 17, foi possível notar que, no nível 4, os picos referentes as concentrações de frutose $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, glicose $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, sacarose $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ e lactose monoidratada $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ são identificados com segurança. Foi realizado teste de outliers, considerando as sextuplicatas de cada composto e não foram detectados outliers em relação aos tempos de retenção.

A Figura 18, representa os cromatogramas correspondentes as amostras identificadas como 5.

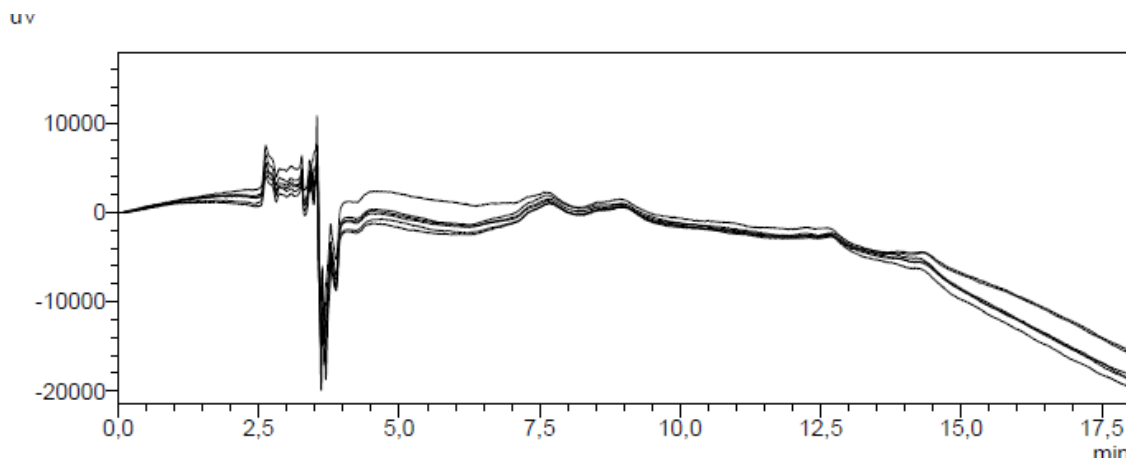
Figura 18 – Cromatograma grupo 5 para determinação do limite de detecção



De acordo com a Figura 18, é possível notar que existem picos referentes as concentrações de lactose monoidratada $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, frutose $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, glicose $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e frutose $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Porém, eles são pequenos e devido ao comprimento de onda da análise, 190 nm, alterações como composição da fase móvel, condições de

pressão, entre outras variações experimentais, podem gerar flutuações na linha de base. E, dessa forma, gerar insegurança ao determinar a presença ou ausência dos picos. Visto isso, o limite de detecção será determinado pelo nível anterior, que apresentou segurança na visualização dos picos. A Figura 19 representa todos os cromatogramas obtidos para o grupo 4, comprovando que os picos podem ser visualizados em todos eles.

Figura 19 - Comparação dos cromatogramas do grupo 4



Portanto, pode ser observado que todos os cromatogramas possuem o mesmo perfil. E, para garantir a segurança de detecção do método, o LD foi definido como $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ para lactose monoidratada, $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ para a frutose $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ para a sacarose e $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ para a glicose. Além disso, foi possível verificar que a concentração de lactose monoidratada a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ não afeta a visualização dos outros picos quando estão em concentrações menores.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível desenvolver um método por cromatografia líquida de alta eficiência para identificação de lactose monoidratada e detecção simultânea da frutose, glicose e sacarose utilizando o detector UV-Vis. Esse detector foi escolhido, uma vez que, apresentou melhor sensibilidade. É observado que a lactose, a frutose, a glicose e a sacarose são capazes de absorver radiação em comprimentos inferiores a 200 nm, ou seja, no ultravioleta distante. Em vista disso, o comprimento utilizado para o desenvolvimento do método foi 190 nm, sendo o menor comprimento possível dentro do espectro UV-Vis. Essa característica limitou o uso de solventes, restringindo a composição da fase móvel a água e acetonitrila, que apresentam baixa absorção nesse comprimento de onda.

Após o desenvolvimento do método, seu desempenho foi verificado através da validação analítica, realizada conforme orientações e critérios da RDC 166/17 da ANVISA e do DOQ-CGCRE-008/2020 do INMETRO. Em vista disso, foram utilizados os ensaios experimentais e testes estatísticos para avaliação dos parâmetros de validação de seletividade e limite de detecção.

Durante os testes para avaliar a seletividade, foi verificado que os tempos de retenção para cada um dos analitos são reprodutíveis, uma vez que, apresentam desvio padrão relativo inferiores a 2%. Isso demonstra que, ao longo de injeções sucessivas, o tempo de retenção para os analitos serão precisos. Além disso, após verificação da normalidade e aleatoriedade dos dados foi possível realizar testes de comparação de variâncias e médias entre grupos. Os primeiros dois grupos de áreas de lactose monoidratada foram contrastados: o primeiro continha apenas o padrão de lactose monoidratada, enquanto o segundo continha o padrão de lactose monoidratada, juntamente com os padrões de frutose, glicose e sacarose. Como resultado, foram obtidos P-valores superiores a 0,05 nos testes F e t, que indicam que as variâncias e médias entre os grupos são equivalentes com 95% de confiança. Isso indica que o método é capaz de identificar e quantificar a lactose mesmo na presença de compostos com estruturas e características similares.

Outra análise realizada para avaliação da seletividade buscava elucidar se diferentes granulometrias possuem efeitos sobre a percepção da lactose pelo método desenvolvido. Essa verificação teve como propósito avaliar se o método pode ser empregado para identificação das matérias-primas lactose monoidratada 200 *mesh* e lactose

monoidratada atomizada *Spray Dried* utilizadas como excipiente na indústria farmacêutica. Nessa avaliação, comparou-se médias e variâncias de áreas de lactose obtidas em diferentes grupos. A primeira comparação avaliou as áreas do padrão de lactose monoidratada e as áreas provenientes da amostra de lactose monoidratada atomizada *Spray Dried* contendo frutose, glicose e sacarose. E, a segunda comparação avaliou as áreas do padrão de lactose monoidratada em contraste com as áreas obtidas pela análise da amostra de lactose monoidratada 200 *mesh* contendo frutose glicose e sacarose. Nos dois casos, foram obtidos P-valores superiores a 0,05, nos testes de variâncias e médias, indicando que os grupos são estatisticamente equivalentes com 95% de confiança. Ou seja, foi possível concluir que o método desenvolvido pode ser aplicado para análise da matéria-prima nas duas granulometrias testadas.

Para avaliação do parâmetro de limite de detecção, foram feitas diluições sucessivas em que foi identificado que o limite mais seguro para visualização de todos os sinais cromatográficos é referente a concentração de 0,6 mg mL⁻¹ de lactose monoidratada, 0,16 mg mL⁻¹ de frutose, 0,4 mg mL⁻¹ de sacarose e 0,4 mg mL⁻¹ de glicose. Além disso, foi possível verificar que a concentração de lactose monoidratada a 1,5 mg mL⁻¹ não afeta a visualização dos outros picos quando estão em concentrações menores.

Portanto, a partir dos parâmetros avaliados o método se mostrou adequado para verificar a identidade de excipientes lactose em diferentes granulometrias. E, como perspectiva, pretende-se sugerir a adaptação da farmacopeia para inserção do método desenvolvido e validado como alternativa aos testes de identificação de matérias-primas de lactose monoidratada.

7. REFERÊNCIAS

- [1] A. B. TOLLER e C. A. SCHIMDT, “Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta,” *Disciplinarum Scientia Saúde*, 2005.
- [2] Y. KUDO, M. YASUDA e S. MATSUSAKA, “Effect of particle size distribution on flowability of granulated lactose,” *Advanced Powder Technology*, 2019.
- [3] E. S. P. & S. D. Neves, “Pharmacopeial specifications and analytical data from post-marketing quality sampling and testing programs: A perspective beyond out-of-specification results.,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, n° <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112935>., 2020.
- [4] A. N. d. V. S. ANVISA, Resolução da diretoria colegiada - RDC n° 511, Brasília, DF: Diário Oficial da União, 27 de Maio de 2021.
- [5] U. S. PHARMACOPEIA, United States Pharmacopeia 44: National Formulary 39, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2021.
- [6] ANMAT, Farmacopea Argentina, Buenos Aires: ANMAT: 8. ed., 2011.
- [7] C. Poole, “Thin-layer chromatography: challenges and opportunities,” *Journal of chromatography*, n° [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00435-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00435-7), 2003.
- [8] A. N. d. V. S. ANVISA, Resolução RDC n° 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, Brasília, DF: Diário Oficial da União: seção 1, 30 mar. 2022.
- [9] M. W. Dong, MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS, JOHN WILEY & SONS: 1st ed., 2006.
- [10] D. A. e. a. SKOOG, Fundamentos de Química Analítica, 8. ed. Tradução de Tito Luiz Dias de Oliveira, São Paulo: Thomson, 2006.
- [11] I. Jalaludin e J. Kim, “Comparison of ultraviolet and refractive index detections in the HPLC analysis of sugars,” *Food Chemistry*, vol. 365, n° <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130514>, 2021.
- [12] “Funed,” 06 abril 2015. [Online]. Available: <https://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2018/11/Bula-do-entecavir-monoidratado-para-o-Paciente.pdf>. [Acesso em 15 Jan 2025].
- [13] “Funed,” 04 Maio 2020. [Online]. Available: <https://www.funed.mg.gov.br/2020/05/geral/funed-realiza-primeira-entrega-do-entecavir-ao-ministerio-da-saude/>. [Acesso em 15 Jan. 2025].
- [14] “Funed,” 25 Nov 2021. [Online]. Available: <https://www.funed.mg.gov.br/wp->

- content/uploads/2022/02/bula-paciente-Funed-talidomida_rev-08.pdf. [Acesso em 15 Jan 2025].
- [15] Funed, “Funed atua no tratamento da hanseníase como única produtora no Brasil da Talidomida,” Funed, 05 Out 2022. [Online]. Available: <https://www.funed.mg.gov.br/2020/01/geral/funed-atua-no-tratamento-da-hanseníase-como-única-produtora-no-brasil-da-talidomida/>. [Acesso em 15 Jan 2025].
- [16] A. N. d. V. S. ANVISA, Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos, Brasília, DF: Diário Oficial da União, 25 de julho de 2017..
- [17] I. N. D. M. Q. E. T. INMETRO, DOQ-CGCRE-08, revisão 09: Orientação sobre validação de métodos analíticos, Duque de Caxias: INMETRO, 2020.
- [18] J. F. e. a. NASCIMENTO, “Excipientes presentes em medicamentos antimicrobianos de diferentes marcas comerciais,” *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*, nº ISSN 2595-4407 , 2019.
- [19] K. A. HETTINGA, *Lactose*, Elsevier: p. 231–266, 2019.
- [20] D. C. S. d. Z. RIBEIRO, “Espectroscopia FTIR, HPLC e redes neurais artificiais para determinação analítica da lactose residual e outros açúcares no leite,” 126 f. *Tese (Doutorado em Ciência Animal)*, 2021.
- [21] S. e. a. DOMINICI, “Lactose: Characteristics, food and drug-related applications, and its possible substitutions in meeting the needs of people with lactose intolerance.,” *Foods*, Vols. %1 de %211, p. 1486, nº Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11101486>., 2022.
- [22] G. A. e. a. TEIXEIRA, “Avaliação do fator de forma da alfa lactose monohidratada em processo de cristalização batelada,” *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, nº DOI: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1377-19580-171374, 2015.
- [23] A. N. D. V. S. ANVISA, Farmacopeia Brasileira, Brasília: ANVISA: 6ª Edição, volume 1, 2019.
- [24] A. e. a. DANUELLO, “Técnicas cromatográficas: princípios, classificações e aplicações,” em *Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros.*, Vol. 2. Editora Científica Digital, 2022. p. 176-190. ISBN 978-65-5360-170-3. DOI: 10.37885/220509051., 2022.
- [25] R. e. a. LINDEN, “Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados,” *Química Nova*, vol. 30, 2007.

- [26] W. e. a. WANG, “Comparison of determination of sugar-PMP derivatives by two different stationary phases and two HPLC detectors: C18 vs. amide columns and DAD vs. ELSD,” *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020.
- [27] C. G. A. d. SILVA, C. B. G. BOTTOLI e C. H. COLLINS, “Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações,” *Química Nova*, 2016.
- [28] T. e. a. Ikegami, “Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography,” *Journal of Chromatography A*, Vols. %1 de %21184, p. 474–503, 2008.
- [29] J. L. CHÁVEZ-SERVÍN, A. I. CASTELLOTE e M. C. LÓPEZ-SABATER, “Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection,” *Journal of Chromatography*, Vols. %1 de %21043, n. 2, p. 211–215, 2004.
- [30] G. Sesta, “Determination of sugars in royal jelly by HPLC,” *Apidologie*, n° <https://doi.org/10.1051/apido:2005061>, 2006.
- [31] H. TANAKA, X. ZHOU e O. MASAYOSHI, “Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography,” *Journal of Chromatography A*, n° [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01949-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01949-0), 2003.
- [32] e. a. TIWARI M, “A Validated HPLC-RID Method for Quantification and Optimization of Total Sugars: Fructose, Glucose, Sucrose, and Lactose in Eggless Mayonnaise,” *Zydus Wellness Institute*, n° <https://doi.org/10.3390/separations10030199>, 2023.
- [33] W. XINMIN e e. al., “Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography,” *Journal of Food Composition and Analysis*, n° <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.006>, 2008.
- [34] P. A. MORETTIN e W. O. BUSSAB, *Estatística Básica*, 9. ed. Vol. 1. São Paulo: Saraiva, 2017.
- [35] D. C. MONTGOMERY e G. C. RUNGER, *Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros*, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.
- [36] J. N. MILLER, J. C. MILLER e R. D. MILLER, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Harlow: Pearson Longman, Vol 1, 7. ed., 2018.
- [37] N. M. RAZALI e Y. B. WAH, “Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests,” *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2011.
- [38] S. S. SHAPIRO e M. B. WILK, “An analysis of variance test for normality (complete samples),” *Biometrika*, n° <https://doi.org/10.2307/2333709>, 1965.

- [39] L. M. A. e. a. BARROSO, “Avaliação do teste generalizado de Durbin-Watson,” vol. 30, nº n. 3, p. 432-441, 2012.
- [40] E. e. a. LAZZAROTTO, “Melhoria na previsão da série temporal de instrumentos de monitoramento de barragem via combinação de métodos,” *Cadernos do IME – Série Estatística*, Vols. %1 de %238, p. 1-19, nº DOI: 10.12957/cadest.2015.18510., 2015.
- [41] ASSOCIAÇÃO DE LABORATÓRIOS ACREDITADOS DE PORTUGAL, “Guia RELACRE 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química,” Lisboa, 2000.
- [42] X. e. a. LIU, “Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corn cob hydrolysate by HPLC-PDA–ELSD,” *Carbohydrate Research*, vol. 353, nº p. 111–114, 2012.
- [43] L. M. F. PRADO, AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE FASES ESTACIONÁRIAS PARA SEPARAÇÕES RÁPIDAS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA UTILIZANDO ANTIDIABÉTICOS ORAIS COMO MODELO, Belo Horizonte: Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- [44] J. V. e. a. ACQUARO, “Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado,” *Scientia Chromatographica*, pp. 137-145, 2013.
- [45] G. F. M. BALL, “The Application of HPLC to the Determination of Low Molecular Weight Sugars and Polyhydric Alcohols in Foods: A Review,” *London UK: Food Chemistry.*, 1990.
- [46] M. C. A. BARROS, “ AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE NA DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE FRUTOSE, GALACTOSE, GLICOSE, SACAROSE, MALTOSE E LACTOSE EM BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS,” *Food Chemistry, Scientific Services Division, London, UK*, 1989.
- [47] A. N. d. V. S. ANVISA, Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 511, Brasília, DF: Diário Oficial da União, 27 de Maio de 2021.
- [48] T. M. P. FIGUEIREDO, Dissertação (Mestrado em Química): Universidade de Coimbra, Lisboa, Portugal, 2012.
- [49] MERCK, “Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ: Lactose Monoidratada,” MERCK, set. 2012. [Online]. Available: <https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2018/10/FISPQ-lactose.pdf>. [Acesso em 12 Dez. 2024].
- [50] J. P. F. e. a. PEREIRA, “PERCENTUAL DE CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE EM CRISTALIZADOR DE BANCADA DE SORO DE LEITE

CONCENTRADO,” *Rev. Inst. Latic.*, 2010.

- [51] K. e. a. Xue, “Preparation and evaluation of a new type of amino-bonded silica chromatographic stationary phase for the determination of lactose,” *Chinese journal of chromatography*, nº <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2017.09022>., 2018.
- [52] W. FRANCISCO JUNIOR, “Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções,” *Química Nova na Escola*, pp. São Paulo, n. 29,, 2008.