

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

LUCIANO TORRES BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL DMF EM TALIDOMIDA POR
HPLC-DAD**

Belo Horizonte, MG

2025

Luciano Torres Barbosa

Desenvolvimento de Método Cromatográfico para Determinação de Solvente Residual DMF
em Talidomida por HPLC-DAD

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
no Curso de Graduação em Química
Tecnológica do Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Química Tecnológica.

Orientador: Dr. Patterson Patrício de Souza
Coorientador: Ms. Rangel Caio Quinino Dutra

Belo Horizonte, MG

2025

Luciano Torres Barbosa

Desenvolvimento de Método Cromatográfico para Determinação de Solvente Residual DMF
em Talidomida por HPLC-DAD

O presente Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Química do
Centro Federal de Educação Tecnológica de
Minas Gerais foi aprovado pela seguinte banca
examinadora:

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

Ms. Rangel Caio Quinino Dutra
(Coorientador – Funed)

Dra. Janice Cardoso Pereira Rocha
(Avaliadora – CEFET-MG)

Ms. Tiago Aparecido da Silva
(Avaliador – Funed)

Belo Horizonte, MG

2025

AGRADECIMENTOS

Como afirma Jean-Jacques Rousseau, “O homem é fruto do meio em que vive”. Eu torço para que isso seja verdade, pois cito abaixo as pessoas maravilhosas com as quais tive contato ao longo da vida, e por elas me considero um sujeito de sorte. É para elas que eu dedico essa monografia.

Aos meus pais, José Geraldo e Girleide, pelo amor e apoio incondicionais em minha jornada.

Aos meus irmãos, Sérgio e Juliana, por me ensinarem as palhaçadas que levarei para o resto da vida e usarei contra seus filhos.

À minha namorada, Manu, por me levar a tantos shows maravilhosos que eu nunca iria sozinho por preguiça.

À minha família, que mesmo com as inúmeras discussões políticas nos grupos de WhatsApp, nunca saiu do meu lado.

Aos meus amigos do ensino médio, por me ouvirem cantar Tim Maia tantas vezes nas chamadas por Discord.

Aos coordenadores do curso Márcio e Janice, pelos reajustes de matrícula, que não foram poucos.

Ao corpo docente do CEFET-MG, pelos ensinamentos que me fizeram o químico que sou hoje.

Aos meus amigos do CEFET-MG, pela companhia nos cafés da cantina.

Aos analistas e técnicos da Funed, pela paciência com as minhas perguntas idiotas.

Às minhas colegas estagiárias da Funed, pelos joguinhos de palavras após o almoço.

A todos com quem tive contato durante a minha trajetória, desculpem pelas brincadeiras.

RESUMO

A talidomida é utilizada no tratamento de hanseníase, lúpus e úlceras aftosas em pacientes portadores de HIV-Aids. O seu Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) deve passar por um controle de qualidade para avaliar a presença de solventes residuais provenientes da sua síntese, dentre os solventes destaca-se a N,N-Dimetilformamida (DMF). Atualmente, o laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico (SCFQ) realiza a análise de solventes residuais por Cromatografia Gasosa por Injeção do *Headspace* acoplada à Espectrometria de Massas (HS-GC/MS). A quantificação do DMF por essa análise é imprecisa por trabalhar próximo do limite de quantificação do equipamento, logo, buscou-se desenvolver um método para detectar e quantificar DMF através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD). Foi utilizada a corrida cromatográfica já realizada no doseamento do IFA. As figuras de mérito analisadas, preconizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Testes preliminares mostraram um coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,980. A análise de seletividade demonstrou através do p -valor de 0,1205 no teste ANOVA (*one-way*) que a presença dos compostos utilizados na análise do teor do IFA não impacta na área do pico de DMF. Na análise de linearidade, a curva com matriz foi reprovada pelo coeficiente de correlação (r) abaixo de 0,990 e pelo r^2 abaixo de 0,980, enquanto a curva sem matriz foi reprovada pelo p -valor de 0,02506 no teste de Shapiro-Wilk, que avalia a normalidade dos resíduos. Na análise da precisão, o DPR do nível 1 do Analista 1 foi de 12,63% enquanto o DPR do nível 2 do Analista 2 foi de 5,46%, ambos acima do critério de 5,3%. Além disso, a curva do Analista 1 obteve um r^2 de 0,8970, abaixo do critério estabelecido de 0,980. Consequentemente, na análise da exatidão, as recuperações do Analista 1 foram de 89,67%, 78,59% e 80,14%, todas fora da faixa estabelecida de 90% a 107%. Devido aos resultados obtidos na análise da linearidade, o LD e o LQ não puderam ser calculados. Na análise da robustez, as variáveis que se mostraram importantes foram o fluxo da fase móvel, a integração do pico, deve ser feita manualmente, o comprimento de onda de detecção e a estabilidade da amostra, que deve ser preparada no dia da análise. Foram observados problemas no HPLC, o que impossibilita que os resultados obtidos sejam avaliados com confiança. Uma nova validação deve ser realizada.

Palavras-chave: N,N-Dimetilformamida; Talidomida; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Insumo Farmacêutico Ativo; solvente residual; *software* R.

ABSTRACT

Thalidomide is used in the treatment of leprosy, lupus, and aphthous ulcers in HIV-Aids patients. Its Active Pharmaceutical Ingredient (API) must undergo quality control to assess the presence of residual solvents from its synthesis, among which N,N-Dimethylformamide (DMF) stands out. Currently, the laboratory of the Physical-Chemical Control Service (SCFQ) performs the analysis of residual solvent by Headspace Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (HS-GC/MS). The quantification of DMF by this analysis is imprecise due to working close to the equipment's quantification limit, therefore, a method was sought to detect and quantify DMF through High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). The chromatographic run already performed in the API dosage was used. The figures of merit analyzed, as recommended by the Collegiate Board Resolution (RDC) No. 166/17 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), were selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit (LD), quantification limit (QL), and robustness. Preliminary tests showed a coefficient of determination (r^2) above 0.980. The selectivity analysis demonstrated, through a p -value of 0.1205 in the one-way ANOVA test, that the presence of compounds used in the API content analysis does not impact the DMF peak area. In the linearity analysis, the curve with matrix was rejected due to a correlation coefficient (r) below 0.990 and an r^2 below 0.980, while the curve without matrix was rejected due to a p -value of 0.02506 in the Shapiro-Wilk test, which evaluates the normality of the residuals. In the precision analysis, the RSD of level 1 for Analyst 1 was 12.63%, while the RSD of level 2 for Analyst 2 was 5.46%, both above the 5.3% criterion. Moreover, Analyst 1's curve obtained an r^2 of 0.8970, below the established criterion of 0.980. Consequently, in the accuracy analysis, Analyst 1's recoveries were 89.67%, 78.59% and 80.14%, all outside the established range of 90% to 107%. Due to the results obtained in the linearity analysis, the DL and QL could not be calculated. In the robustness analysis, the variables that proved to be important were the mobile phase flow rate, the peak integration, which should be performed manually, the detection wavelength, and the sample stability, which should be prepared on the day of analysis. Issues were encountered in the HPLC, preventing the obtained results from being assessed with confidence. A new validation should be conducted.

Keywords: N,N-Dimethylformamide; Thalidomide; High Performance Liquid Chromatography; Active Pharmaceutical Ingredient; residual solvents; R software.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do DMF.....	2
Figura 2 – Esquema de decomposição do DMF por hidrólise	3
Figura 3 – Estrutura química da talidomida	4
Figura 4 – Par de enantiômeros da talidomida	4
Figura 5 – Rota de síntese da talidomida.....	5
Figura 6 – Cromatograma de uma solução contendo 16 analitos obtido por GC-MS	6
Figura 7 – Diagrama de blocos de um GC	7
Figura 8 – Esquema de um FID.....	8
Figura 9 – Diagrama de blocos de um MS	9
Figura 10 – Espectro de massas da cafeína	9
Figura 11 – Exemplo de emprego de HS.....	11
Figura 12 – Esquema de um HPLC	12
Figura 13 – Esquema de um detector de absorbância no UV/Vis.....	14
Figura 14 – Espectro tridimensional obtido através do HPLC-DAD.....	15
Figura 15 – Curva de calibração preliminar para avaliação do comprimento de onda	34
Figura 16 – Curva de calibração preliminar para avaliação da faixa de trabalho	35
Figura 17 – Cromatograma do pico de DMF antes do ajuste de taxa de amostragem.....	36
Figura 18 – Cromatograma do pico de DMF depois do ajuste de taxa de amostragem.....	36
Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos de picos de DMF da curva de calibração.....	37
Figura 20 – Curvas de calibração preliminares para avaliação da repetibilidade	37
Figura 21 – Curva de calibração preliminar final.....	39
Figura 22 – Curvas de calibração em 215 nm do teste de linearidade	41
Figura 23 – Curvas de calibração em 200 nm do teste de linearidade	46
Figura 24 – Resíduos das curvas em 200 nm do teste de linearidade	47
Figura 25 – Curvas de calibração obtidas pelos analistas no teste de precisão.....	51

Figura 26 – Cromatogramas das injeções do teste de linearidade.....	53
Figura 27 – Cromatogramas do teste de linearidade sobrepostos	54
Figura 28 – Cromatograma do teste de linearidade com sobreposição de picos.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do DMF	3
Quadro 2 – Parâmetros a serem considerados na validação analítica	16
Quadro 3 – Condições de análise	23
Quadro 4 – Variáveis e seus limites	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Volumes pipetados e concentrações aproximadas por nível	26
Tabela 2 – Nível das variáveis por análise	33
Tabela 3 – Coeficientes de correlação em função do comprimento de onda	34
Tabela 4 – Coeficientes de determinação das curvas preliminares	37
Tabela 5 – Resultados obtidos no teste de seletividade	40
Tabela 6 – Análises estatísticas do teste de seletividade	40
Tabela 7 – Resultados obtidos nas curvas com matriz no teste de linearidade (215 nm)	42
Tabela 8 – Resultados obtidos nas curvas sem matriz no teste de linearidade (215 nm)	43
Tabela 9 – Resultados obtidos nas curvas com matriz no teste de linearidade (200 nm)	44
Tabela 10 – Resultados obtidos nas curvas sem matriz no teste de linearidade (200 nm)	45
Tabela 11 – Resultados de DPR dos níveis das curvas de calibração	46
Tabela 12 – Análises estatísticas das curvas com matriz do teste de linearidade	47
Tabela 13 – Análises estatísticas das curvas sem matriz do teste de linearidade	48
Tabela 14 – Resultados obtidos pelo Analista 1 no teste de precisão	49
Tabela 15 – Curva de calibração obtida pelo Analista 1 no teste de precisão	49
Tabela 16 – Resultados obtidos pelo Analista 2 no teste de precisão	50
Tabela 17 – Curva de calibração obtida pelo Analista 2 no teste de precisão	50
Tabela 18 – Análises estatísticas do teste de precisão	51
Tabela 19 – Resultados de recuperação do teste de exatidão	52
Tabela 20 – Resultados obtidos no teste de robustez	55
Tabela 21 – Resultado do ANOVA (<i>multi-way</i>) para o teste de robustez	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionização Química)
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector por Arranjo de Diodos)
DCQ	Divisão de Controle de Qualidade
DI	Diretoria Industrial
DMF	N,N-Dimetilformamida
DPR	Desvio Padrão Relativo (%)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionização por Elétrons)
FDS	Ficha de Dados de Segurança
FE	Fase estacionária
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de Ionização por Chama)
FM	Fase móvel
Funed	Fundação Ezequiel Dias
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HS	<i>Headspace sampling</i> (amostragem por <i>headspace</i>)
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LD	Limite de detecção
LOF	<i>Lack of fit</i> (falta de ajuste)
LQ	Limite de quantificação
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
NPT	Número de pratos teóricos
NR	Norma Regulamentadora
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SCFQ	Serviço de Controle Físico-Químico
SQC	Substância Química de Referência Caracterizada
TOF	<i>Time of flight</i> (Tempo de voo)
UV/Vis	Ultravioleta/Luz visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Nível de significância
λ	Comprimento de onda
H_0	Hipótese Nula
H_1	Hipótese Alternativa
m/z	Razão massa/carga
p -valor	Probabilidade de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coefficiente de correlação
r^2	Coefficiente de determinação
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i> (Razão sinal/ruído)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1.	N,N-Dimetilformamida	2
2.2.	Talidomida	4
2.3.	Cromatografia	6
2.3.1.	Cromatografia Gasosa	7
2.3.1.1.	Detector: Ionização por Chama	8
2.3.1.2.	Detector: Espectrometria de Massas	8
2.3.1.3.	Amostragem por <i>Headspace</i>	10
2.3.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	11
2.3.2.1.	Separação por partição	13
2.3.2.2.	Detector: Absorbância no Ultravioleta/Visível e Arranjo de Diodos	13
2.4.	Validação analítica	15
2.4.1.	Seletividade	16
2.4.2.	Linearidade	17
2.4.3.	Precisão	17
2.4.4.	Exatidão.....	17
2.4.5.	Limite de detecção	18
2.4.6.	Limite de quantificação	18
2.4.7.	Robustez	18
2.5.	Testes Estatísticos	19
2.5.1.	Teste de Shapiro-Wilk	19
2.5.2.	Teste de Grubbs.....	20
2.5.3.	Teste de Resíduos Padronizados de Jackknife	20
2.5.4.	Teste de Breusch-Pagan.....	21

2.5.5.	Teste ANOVA	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1.	Condições cromatográficas.....	23
3.2.	Reagentes utilizados	24
3.3.	Preparo das soluções utilizadas.....	24
3.3.1.	Solução de ácido fosfórico 1% (V V ⁻¹).....	24
3.3.2.	Solução padrão de fenacetina.....	24
3.3.3.	Solução padrão de talidomida.....	25
3.3.4.	Solução padrão estoque de DMF	25
3.3.5.	Soluções da curva de calibração	26
3.3.5.1.	Soluções de nível 1	26
3.3.5.2.	Soluções de nível 2	27
3.3.5.3.	Soluções de nível 3	27
3.3.5.4.	Soluções de nível 4	27
3.3.5.5.	Soluções de nível 5	28
3.3.6.	Solução limite de DMF.....	28
3.3.7.	Solução limite de DMF contendo matriz.....	28
3.4.	Testes preliminares	29
3.5.	Validação analítica	29
3.5.1.	Análise da seletividade.....	29
3.5.2.	Análise da linearidade.....	30
3.5.3.	Análise da precisão.....	30
3.5.4.	Análise da exatidão.....	31
3.5.5.	Análise do limite de detecção.....	31
3.5.6.	Análise do limite de quantificação	32
3.5.7.	Análise da robustez	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1.	Testes preliminares	34
4.2.	Seletividade	39
4.3.	Linearidade	41
4.4.	Precisão e exatidão	48
4.5.	Limites de detecção e quantificação	54
4.6.	Robustez	55
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	APÊNDICE A – Script R para Análises Estatísticas	62

1. INTRODUÇÃO

Um Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), também chamado de princípio ativo, é a principal substância de um medicamento, visto que é o IFA que confere ao fármaco o seu efeito terapêutico. Os IFAs podem ser de origem natural, como proteínas ou enzimas, ou podem ser de origem sintética, sendo produzidos em laboratórios especializados. Devido à sua importância na saúde, deve haver um eficiente controle de qualidade, tanto no início de sua fabricação até o seu envase no recipiente final, destinado ao uso público (Oliveira; Silveira, 2021).

Ao final da produção dos princípios ativos sintéticos, um dos parâmetros a serem observados é a quantidade de solventes remanescentes do processo produtivo, os denominados solventes residuais. De acordo com o Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH), os solventes podem ser classificados em três classes: Classe 1 (solventes a serem evitados), Classe 2 (solventes a serem limitados) e Classe 3 (solventes com baixo potencial tóxico). Tipicamente, as metodologias de análise envolvem técnicas cromatográficas. Em alguns casos, como na presença exclusiva de solventes de Classe 3, um método não específico é utilizado, como perda por dessecação (ICH, 2019).

Atualmente, a análise do IFA talidomida, realizada no laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico (SCFQ) da Divisão de Controle de Qualidade (DCQ) da Fundação Ezequiel Dias (Funed), é feita através da técnica de Cromatografia Gasosa por Injeção do *Headspace* acoplada à Espectrometria de Massas (HS-GC/MS, do inglês *Headspace- Gas Chromatography/Mass Spectrometry*), onde uma amostra previamente tratada é lacrada em um *vial*, que é inserido em um forno e, após atingido o equilíbrio entre a fase líquida e a gasosa, uma alíquota da fração gasosa é injetada no cromatógrafo.

No ensaio da talidomida, um dos solventes residuais analisados é a N,N-Dimetilformamida (DMF), cujo teor não deve ser superior a 880 mg kg⁻¹ (Funed, 2022). A sua faixa de temperatura de ebulição é de 153 °C (Sigma-Aldrich, 2024), enquanto a temperatura máxima do interior do *vial* dentro do forno é de apenas 150 °C. Por essas temperaturas serem tão próximas, o equipamento acaba realizando a análise próximo do limite de quantificação, e a probabilidade de se obter falsos positivos e falsos negativos se torna alta, devido à variabilidade dos resultados das análises. Alternativamente ao GC, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) não necessita que seus analitos estejam volatilizados, se mostrando uma alternativa ao HS-GC/MS por eliminar o obstáculo da temperatura na análise de solventes residuais. O desenvolvimento de

uma técnica analítica robusta é de grande interesse para a indústria farmacêutica, pois aumenta a confiança dos resultados obtidos e melhora a eficiência operacional nos laboratórios.

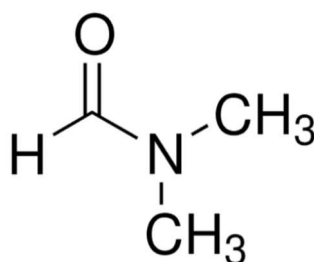
O principal objetivo do presente trabalho é desenvolver um método analítico para detectar e quantificar de forma confiável e reprodutível o solvente DMF através do HPLC com Detector por Arranjo de Diodos (DAD), alternativo ao HS-GC/MS, no IFA talidomida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. N,N-Dimetilformamida

A N,N-Dimetilformamida (DMF) é um composto orgânico polar de fórmula molecular C_3H_7NO , pertencente à classe das amidas. De acordo com a sua nomenclatura, a sua estrutura (Figura 1) é composta por dois grupos metil ($-CH_3$) ligados diretamente ao nitrogênio, que está ligado a um grupo carbonílico ($-CHO$).

Figura 1 – Estrutura química do DMF



Fonte: Sigma-Aldrich (2024).

O solvente é considerado universal por ser amplamente utilizado em conjunto com água e outros solventes orgânicos, como álcoois e ésteres. Sendo um solvente com baixa taxa de evaporação, o DMF é frequentemente utilizado na indústria química (Louvis; Silva, 2016). No Quadro 1 estão descritas as principais propriedades físico-químicas do DMF.

A sua alta faixa de temperatura de ebulição se deve às forças de atração intensas que ocorrem entre as suas moléculas. Também devido a essas forças, o DMF se torna um ótimo solvente para sais e compostos com alta massa molecular. Por ser um solvente polar aprótico, ou seja, não possui em sua estrutura hidrogênios ácidos ligados a elementos eletronegativos, ele é capaz de solvatar com eficiência cátions, mas não ânions. Devido à água residual proveniente de sua síntese, o DMF pode sofrer decomposição por hidrólise, como pode ser

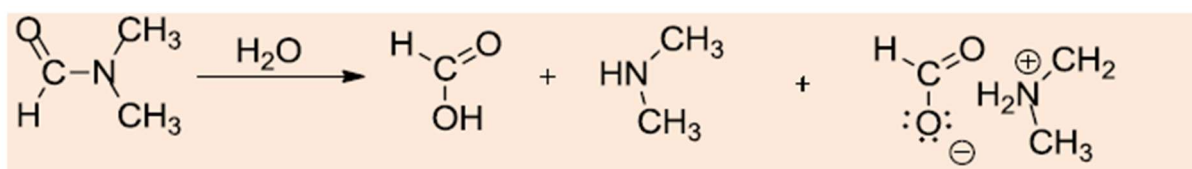
observado na Figura 2, formando dimetilamina, ácido fórmico e formiato de dimetilamina, este último em menor quantidade (Louvis; Silva, 2016).

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do DMF

Fórmula molecular	C ₃ H ₇ NO
Massa molar	73,09 g mol ⁻¹
Cor	Incolor ou amarelado
Odor	Amoniacal
pH	6,7
Constante dielétrica	$\varepsilon = 36,71$ (25 °C)
Ponto de fusão	-61 °C
Ponto de ebulição	153 °C
Densidade a 25 °C	0,9445
Índice de refração	1,42803
Ponto de fulgor	67 °C
Viscosidade	0,80 cP

Fonte: Louvis; Silva (2016).

Figura 2 – Esquema de decomposição do DMF por hidrólise



Fonte: Louvis; Silva (2016).

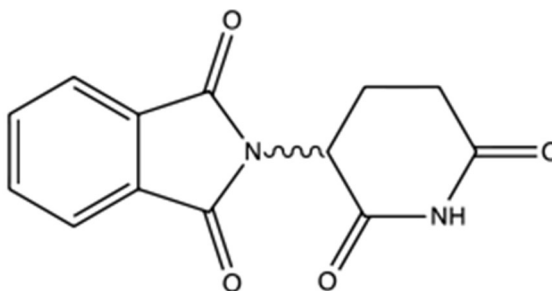
Segundo a sua Ficha de Dados de Segurança (FDS), o DMF é irritante à pele e nocivo ao sistema respiratório (Sigma-Aldrich, 2024). Estudos apontam que o solvente é hepatotóxico, ou seja, causa degeneração do fígado, necrose hepática e hipertrofia hepatocelular. Outros apontam a ocorrência de taquicardia e um aumento na pressão sanguínea. Os principais sintomas da exposição aguda são: irritação nos olhos, na pele e nas vias respiratórias, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, dermatite e vermelhidão facial (Louvis; Silva, 2016). Além disso, pode também causar redução da fertilidade, da fecundação ou má formação craniofacial (Sigma-Aldrich, 2024).

O Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH), através do documento Q3C(R6), classifica o DMF como um solvente Classe 2, sendo a sua exposição diária permitida de 8,8 mg (ICH, 2019). Na Funed, o limite de DMF adotado foi de 880 ppm (mg kg⁻¹) no IFA talidomida (Funed, 2022).

2.2. Talidomida

A talidomida (Figura 3) é um composto químico desenvolvido na Alemanha na década de 1950 para ser utilizado como sedativo e hipnótico, porém foi amplamente comercializada e prescrita para tratar náuseas e vômitos, principalmente em mulheres grávidas.

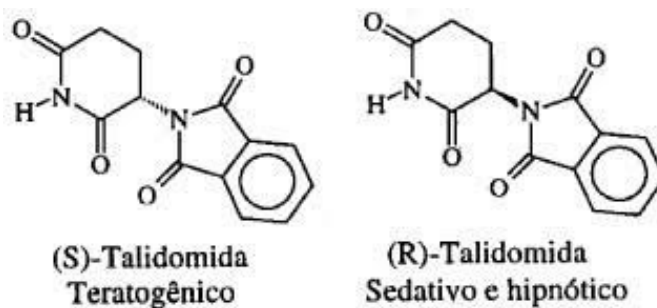
Figura 3 – Estrutura química da talidomida



Fonte: ABPST (2021).

O seu uso levou a um dos maiores desastres médicos da história, com um grande número de recém-nascidos sofrendo de graves deformidades congênitas (ABPST, 2021). A talidomida é um composto quiral, apresentando seus enantiômeros (Figura 4) com atividades farmacológicas distintas.

Figura 4 – Par de enantiômeros da talidomida

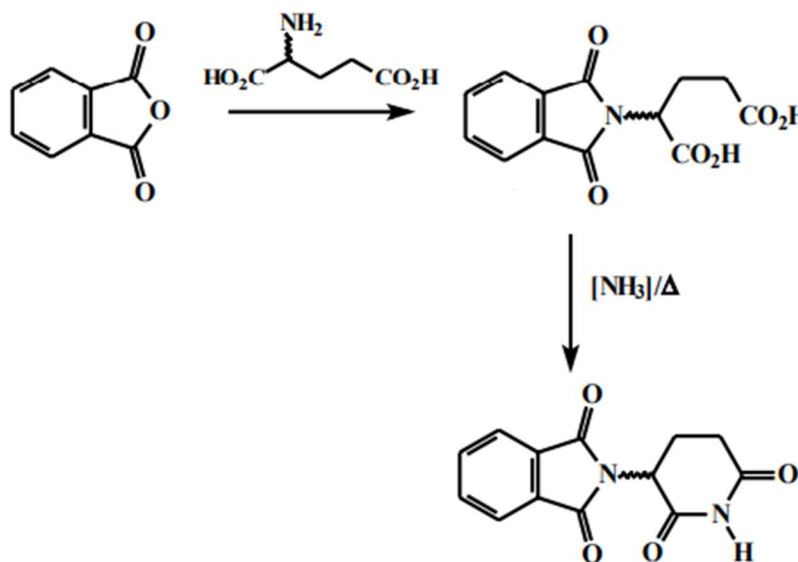


Fonte: Barbosa (2018).

Enquanto um enantiômero exibe os efeitos terapêuticos desejados do medicamento, o outro enantiômero é responsável pelos efeitos teratogênicos associados à droga (Barbosa, 2018). As propriedades teratogênicas foram um dos aspectos mais estudados do composto. A administração do enantiômero (S) durante o primeiro trimestre da gravidez levou ao desenvolvimento de sérias deformidades congênitas nos membros dos fetos, como a focomelia, na qual os membros superiores ou inferiores eram gravemente afetados (ABPST, 2021). Não é possível administrar apenas o isômero (R), pois tanto na produção quanto no corpo vivo, as formas da talidomida sofrem interconversão, impossibilitando assim a sua separação (Borges; Fröhlich, 2003). Atualmente, a talidomida é utilizada no tratamento de hanseníase, lúpus e úlceras aftosas em pacientes portadores de HIV-Aids. Apenas pessoas adultas podem fazer uso do medicamento, seguindo orientações médicas e regras de controle de uso: o resultado do teste de sangue para β -HCG ou urinário deve ser negativo e a pessoa deve concordar com o uso de dois métodos contraceptivos, um de barreira e outro hormonal (Funed, 2020).

A síntese do IFA (Figura 5) é realizada através da condensação do (R,S)-ácido glutâmico com anidrido ftálico, seguida pela condensação do intermediário ftamídico com amônia em altas temperaturas (Lima; Fraga; Barreiro, 2001).

Figura 5 – Rota de síntese da talidomida

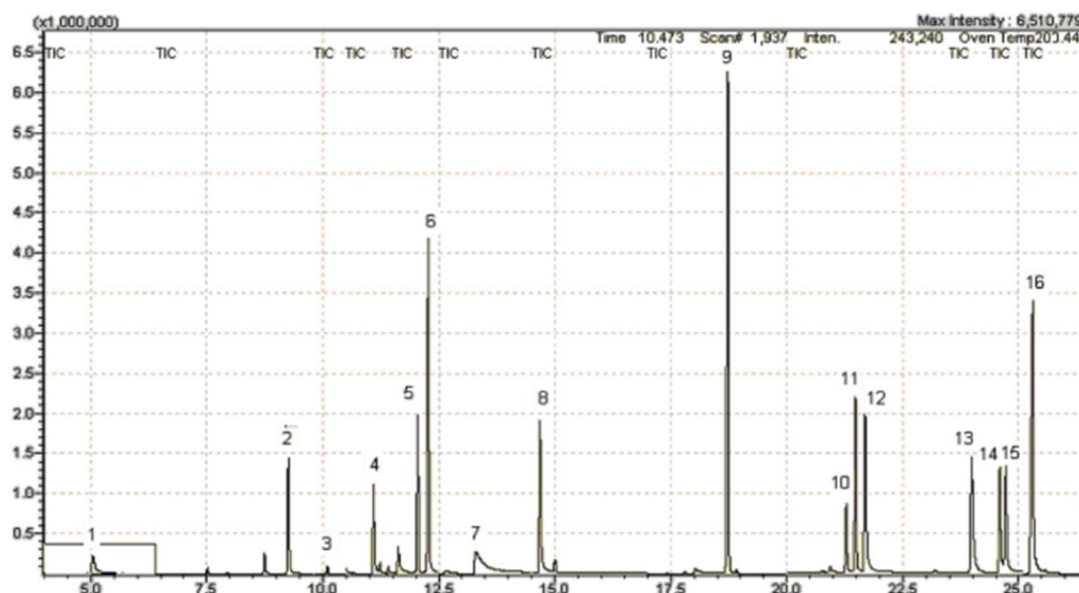


Fonte: Lima; Fraga; Barreiro (2018).

2.3. Cromatografia

Segundo Skoog *et al.* (2006, p. 875): “A cromatografia é um método empregado de forma ampla que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. ” Tal técnica é fundamentada na diferença das propriedades inerentes às moléculas dos analitos da solução, como polaridade, tamanho de partícula, peso molecular, solubilidade, entre outras. Para que esta separação seja realizada, a amostra contendo os analitos de interesse deve percorrer uma determinada fase estacionária (FE), sendo transportada por uma fase móvel (FM). Ao longo do percurso, os analitos interagem com a fase estacionária de acordo com as suas propriedades físico-químicas, possibilitando que sejam separados e detectados em momentos diferentes, permitindo assim a sua identificação (Skoog *et al.*, 2006). Dentre as cromatografias existentes, destacam-se para o presente trabalho a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). A Figura 6 representa um cromatograma típico fornecido por tais equipamentos.

Figura 6 – Cromatograma de uma solução contendo 16 analitos obtido por GC-MS



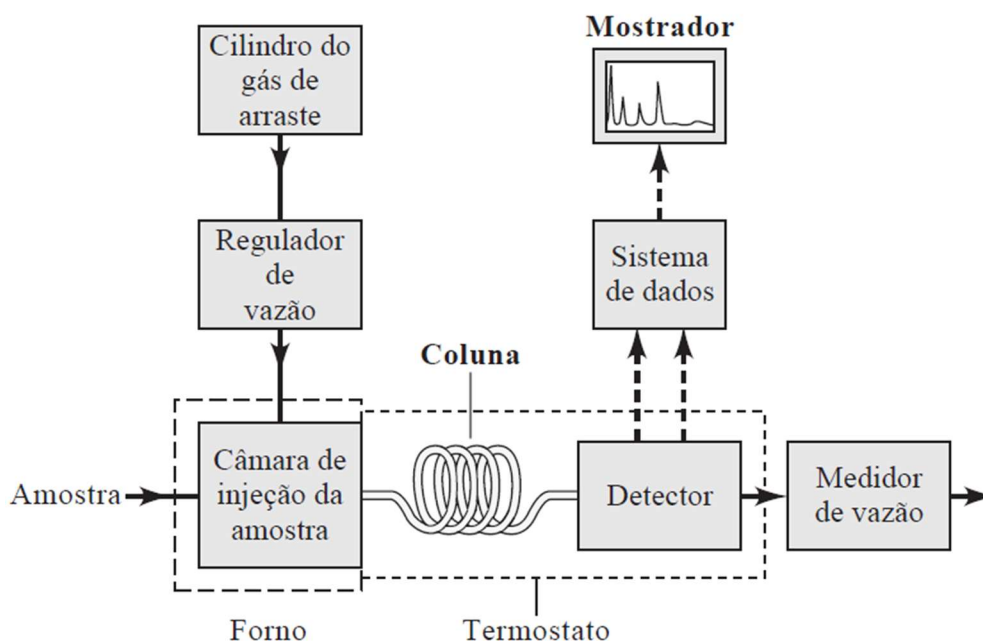
Fonte: Menezes Filho (2010).

2.3.1. Cromatografia Gasosa

No GC, é utilizado um gás de arraste inerte como FM e um líquido ou sólido adsorvido no interior da coluna capilar como FE. Os gases de arraste mais utilizados são o hélio, o argônio, o nitrogênio e o hidrogênio, enquanto a fase estacionária varia amplamente, dependendo do analito de interesse a ser detectado e da matriz da amostra (Skoog *et al.*, 2006).

O equipamento (Figura 7) consiste em uma câmara de injeção, sendo responsável por inserir e vaporizar a amostra, que segue para a coluna cromatográfica, localizada dentro de um forno com temperatura regulada, seguida de um sistema de detecção, responsável por fornecer a resposta da corrida cromatográfica.

Figura 7 – Diagrama de blocos de um GC



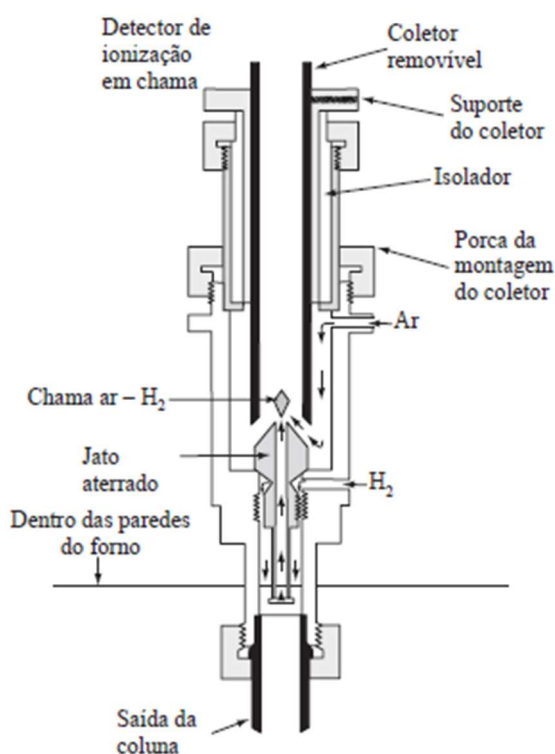
Fonte: Skoog *et al.* (2006).

Diversos são os detectores que podem ser utilizados, variando de acordo com o tipo de amostra a ser analisada. Devem apresentar uma sensibilidade adequada ao método, boa estabilidade, boa reprodutibilidade e uma resposta linear em diferentes ordens de grandeza do analito (Skoog *et al.*, 2006).

2.3.1.1. Detector: Ionização por Chama

O detector de ionização por chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*) (Figura 8) é utilizado exclusivamente para compostos orgânicos, através da detecção dos íons produzidos pela redução do carbono na chama de ar/hidrogênio. Como a resposta do FID é proporcional ao número de átomos de carbono por unidade de tempo, pode ser considerado um detector sensível à massa em vez da concentração (Skoog *et al.*, 2006). Os íons formados são capturados por um eletrodo (coletor), que aumenta a condutividade e a corrente gerada é detectada, amplificada e registrada, gerando o sinal analítico (Pedrosa, 2018).

Figura 8 – Esquema de um FID



Fonte: Skoog *et al.* (2006).

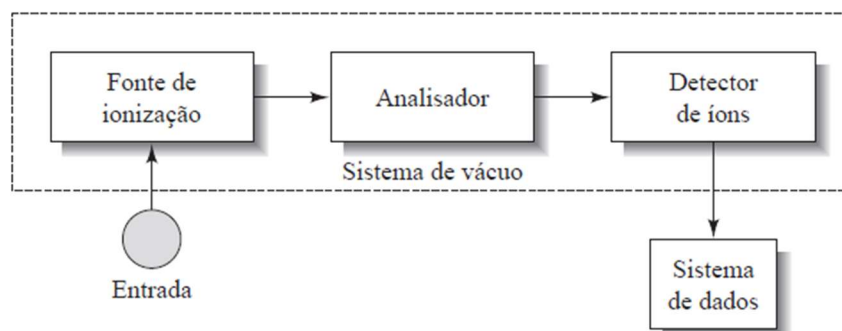
2.3.1.2. Detector: Espectrometria de Massas

Skoog *et al.* (2006) enfatiza o detector por espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) como um dos detectores mais poderosos para o GC. Bastante aplicado na identificação de compostos orgânicos, o MS é capaz de determinar a massa molecular de uma

substância, analisar a composição de amostras complexas e auxiliar na elucidação de estruturas químicas (Nascimento *et al.*, 2018).

O equipamento (Figura 9) é composto por três partes: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector de íons.

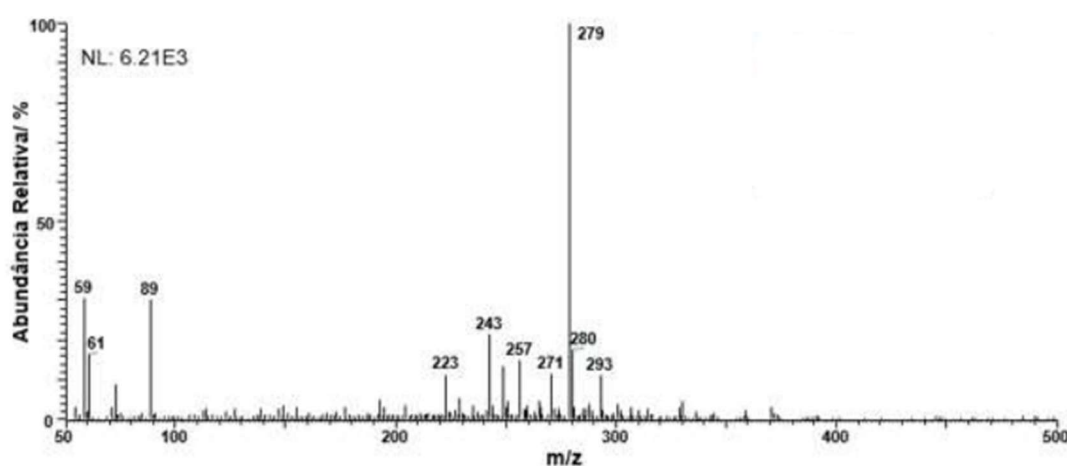
Figura 9 – Diagrama de blocos de um MS



Fonte: Skoog *et al.* (2006).

A amostra é introduzida no sistema na fonte de ionização, produzindo fragmentos das moléculas presentes na FM, que seguem para o analisador de massas, responsável por selecionar os íons de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), chegando ao detector de íons em tempos distintos, gerando assim o espectro de abundância relativa por m/z (Figura 10).

Figura 10 – Espectro de massas da cafeína



Fonte: Pereira (2020).

Entre as fontes de ionização utilizadas no GC-MS, destacam-se a ionização por elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*), onde um feixe de elétrons bombardeia as moléculas,

produzindo íons positivos, negativos e neutros (Skoog *et al.*, 2006), e a ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), onde um gás reagente (geralmente metano, isobutano ou amônia) é ionizado e reage com as moléculas na amostra, gerando uma grande abundância do íon molecular (Nascimento *et al.*, 2018).

Já os analisadores de massas mais utilizados são: quadrupolo linear, composto por quatro tubos metálicos cilíndricos que sofrem variações de corrente e formam um campo eletromagnético, conduzindo o íon selecionado ao detector (Nascimento *et al.*, 2018); armadilha de íons (*ion trap*), onde os íons são retidos em uma célula cúbica por eletrodos e são liberados em sequência crescente de m/z (Skoog *et al.*, 2006); tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*), em que os íons de energia cinética iguais se movem livremente pelo analisador, porém massas maiores irão levar mais tempo para atingir o detector (Skoog *et al.*, 2006). Diferentes analisadores podem ser utilizados em sequência para aumentar a sensibilidade e reduzir a interferência, como o triplo-quadrupolo, o quadrupolo-tempo de voo e o quadrupolo-*ion trap* (Nascimento *et al.*, 2018).

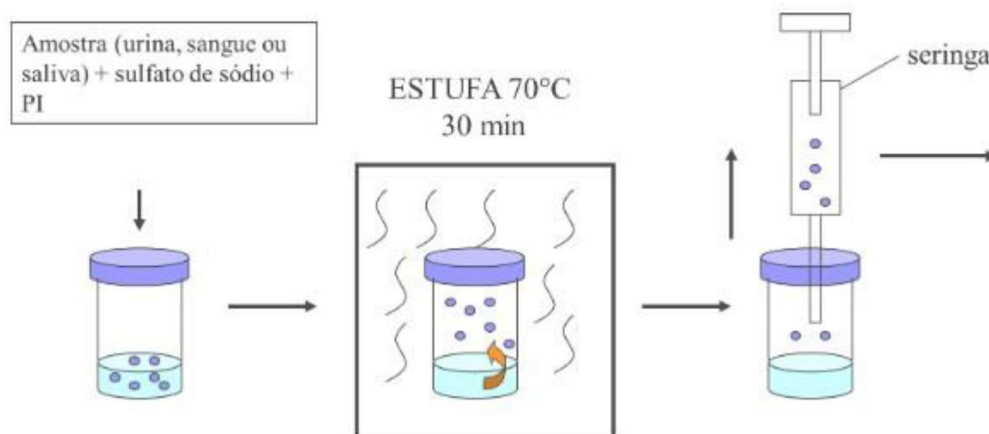
Por fim, os detectores de íons mais utilizados são o multiplicador de elétrons, que consiste em um cátodo onde os íons colidem e liberam elétrons adicionais, que são atraídos para um dinodo e geram o sinal analítico, e a ressonância ciclotrônica de íons, que induzem um sinal cujas frequências são inversamente proporcionais ao m/z (Skoog *et al.*, 2006).

2.3.1.3. Amostragem por *Headspace*

A amostragem por *headspace* (HS) geralmente é empregada para analisar componentes voláteis de amostras complexas com menos interferência, porém também pode ser empregada quando a amostra possui um certo potencial em contaminar o sistema de injeção (Nascimento *et al.*, 2018). O HS é um método mais sensível em comparação à injeção direta, pois permite que seja utilizando um maior volume de amostragem e uma menor taxa de *split*, inserindo mais analito na coluna cromatográfica (Frink; Weatherly; Armstrong, 2014).

A amostra é condicionada a um frasco lacrado contendo uma tampa com septo perfurável (Figura 11). Em seguida, o frasco é inserido em um forno com temperatura controlada, onde ocorrerá a volatilização dos compostos com menor ponto de ebulição. Atingido o equilíbrio entre as fases líquida e gasosa após o tempo de incubação, o amostrador contendo uma seringa aquecida coleta um volume pré-determinado da fase gasosa do frasco e insere na coluna, dando início à corrida cromatográfica.

Figura 11 – Exemplo de emprego de HS



Fonte: Lomba *et al.* (2023).

2.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

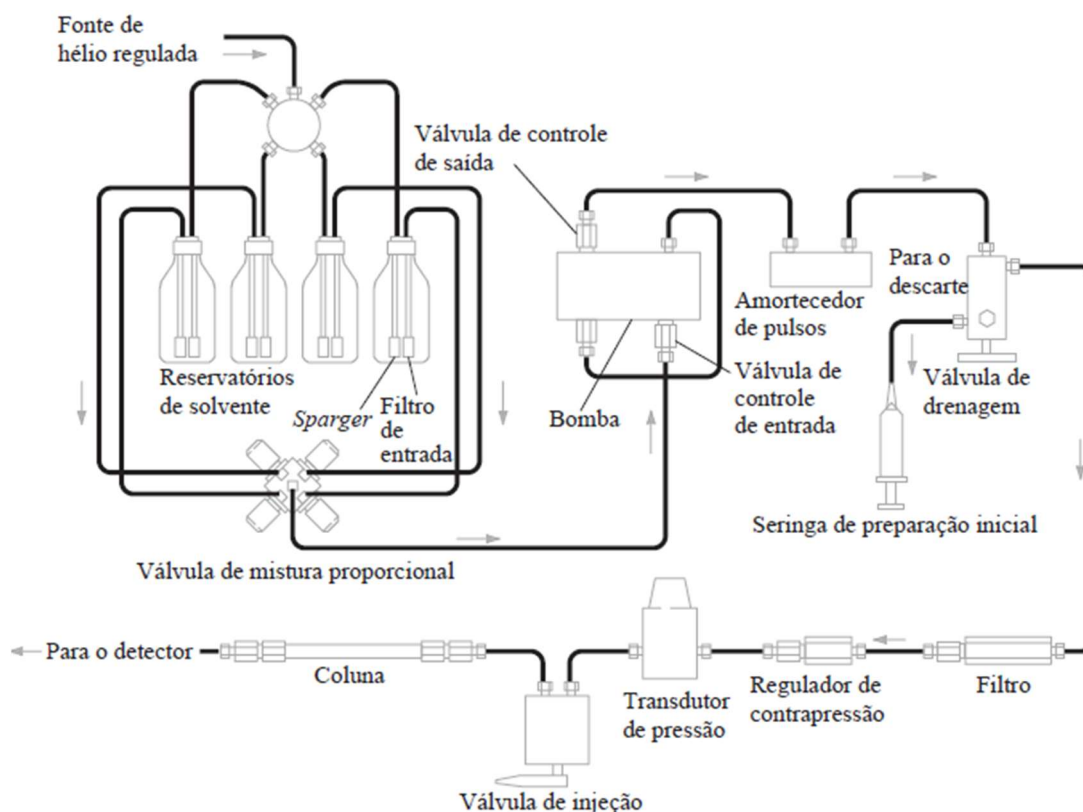
Diferentemente do GC, o HPLC opera com matrizes líquidas que não podem ou não necessitam de volatilização. A FM utilizada é um líquido, geralmente uma mistura de solventes orgânicos e/ou aquosos, que é bombeada através de uma coluna contendo a FE. As escolhas tanto da FM quanto da FE dependem do analito a ser detectado, sendo que a técnica é amplamente utilizada para uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. No HPLC é possível realizar uma corrida cromatográfica utilizando um único solvente (chamada de eluição isocrática) ou mais de um solvente, podendo variar ao longo da corrida (chamada de eluição por gradiente), o que pode melhorar a eficiência na separação dos analitos (Skoog *et al.*, 2006).

O equipamento (Figura 12) tende a ser mais caro e complexo do que o de outras cromatografias (Skoog *et al.*, 2006). Ele consiste em um sistema de bombeamento dos solventes utilizados, passando por um circuito de homogeneização e filtração das FMs, seguido da injeção da amostra e da coluna cromatográfica, e por fim atingindo o detector.

Inicialmente, é necessário remover quaisquer gases dissolvidos na FM, uma vez que interferem diretamente na qualidade da análise. Uma dessas maneiras é adicionando Hélio aos frascos de FM, em seguida da purga das mesmas. Os solventes a serem utilizados são bombeados até uma válvula de mistura controlada por *software* ou diretamente pela interface do módulo e passam por um amortecedor de pulsos para uniformizar o fluxo, neutralizando a interferência da bomba. Na purga ou na limpeza dos tubos capilares do equipamento, a válvula de drenagem deve estar aberta para impedir que qualquer material estranho obstrua uma linha

ou atinja a coluna e o detector. Para garantir isso durante a eluição, utiliza-se um filtro, seguido de um sistema de padronização da pressão. A amostra é introduzida ao sistema através da válvula de injeção, carregada pela FM ao longo da coluna cromatográfica e os analitos atingem o detector ao final da corrida.

Figura 12 – Esquema de um HPLC



Fonte: Skoog *et al.* (2006).

O método de preparo da amostra a ser analisada por HPLC precisa ser planejado corretamente. O solvente escolhido deve solubilizar completamente a amostra. Além disso, a matriz deve possuir a mesma composição da FM para que o fluxo dos analitos seja homogêneo. Ao transferir a solução para o *vial*, é necessária a utilização de uma membrana filtrante com poro 0,45 μm , para reter qualquer partícula que possa obstruir a seringa ou as tubulações capilares do equipamento.

Os tipos de cromatografia líquida são classificados pelo mecanismo de separação da coluna cromatográfica. O principal utilizado é a cromatografia por partição, mas também são utilizados os mecanismos por adsorção, por troca iônica e por exclusão de tamanho. Assim

como no GC, os detectores do HPLC também variam em técnicas, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada.

2.3.2.1. Separação por partição

O mecanismo de partição opera utilizando um líquido tanto como FM quanto como FE, ambos sendo imiscíveis. A separação é empregada para espécies tanto polares quanto apolares e de peso molecular relativamente baixo. Na partição em fase normal, utiliza-se uma FM apolar (como hexano) e uma FE polar (como água ou éter). Moléculas apolares eluem primeiro por realizarem poucas interações com a FE, e esse tempo de retenção na coluna tende a reduzir ao aumentar a polaridade da FM. Já na partição em fase reversa, utiliza-se uma FM polar (como água, metanol ou acetonitrila) e uma FE apolar (como hidrocarbonetos). Moléculas polares eluem primeiro por realizarem poucas interações com a FE, e esse tempo de retenção tende a crescer ao aumentar a polaridade da FM. Em geral, a tendência das análises é igualar a polaridade do analito de interesse com a polaridade da FE (Skoog *et al.*, 2006).

Atualmente, estima-se que 75% de todas as análises realizadas por HPLC utilizem o mecanismo de partição em fase reversa (Skoog *et al.*, 2006), devido à possibilidade de utilizar água como FM, uma vez que um dos custos relativamente altos do instrumento é justamente o gasto com FM. A partição é empregada na análise de diversos tipos de amostra, como antibióticos em produtos farmacêuticos, amostras biológicas, aditivos alimentares, tensoativos, pesticidas, fenóis, drogas, venenos, entre outras (Skoog *et al.*, 2006).

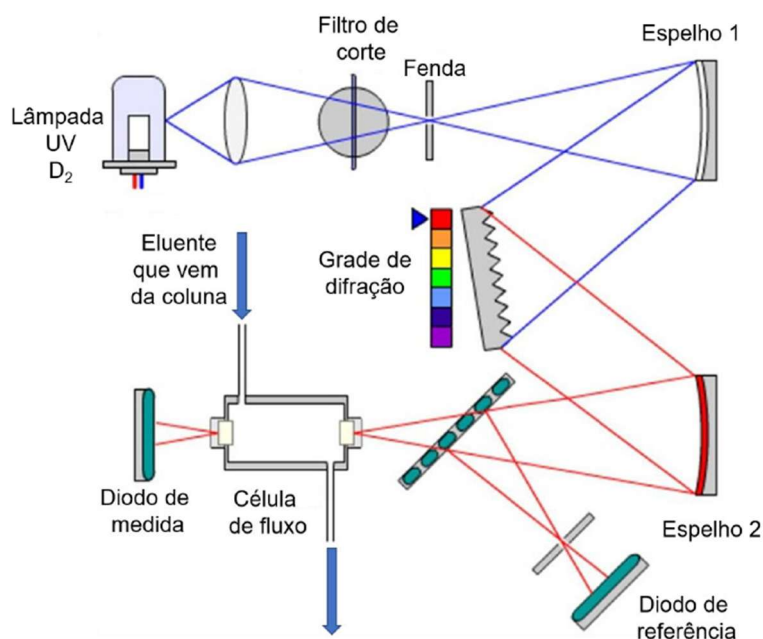
2.3.2.2. Detector: Absorbância no Ultravioleta/Visível e Arranjo de Diodos

A detecção por absorbância na região do UV/Vis é utilizada para compostos que possuem grupos cromóforos em sua estrutura (Collins; Braga; Bonato, 2006, *apud* Belmonte, 2023)¹. Atualmente, são os detectores mais empregados em HPLC devido à vasta gama de analitos que absorvem na região do UV/Vis (Menezes Filho, 2010), além de sua simplicidade, alta sensibilidade e baixo custo. A resposta analítica fornecida como absorbância é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra (Belmonte, 2023). O detector de UV/Vis

¹ COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: **Editora da Unicamp**, 1ª ed., 2006. 456 p.

(Figura 13) funciona da seguinte maneira: uma lâmpada de deutério ou de tungstênio gera uma fonte de radiação eletromagnética, que é, através de uma série de espelhos, direcionada a uma grade de difração ou um prisma dispersivo (monocromadores), responsáveis por separar a radiação em seus comprimentos de onda (λ) distintos. O instrumento seleciona o λ e incide a radiação sobre um diodo de referência e sobre um diodo de medida, onde registra a resposta do analito.

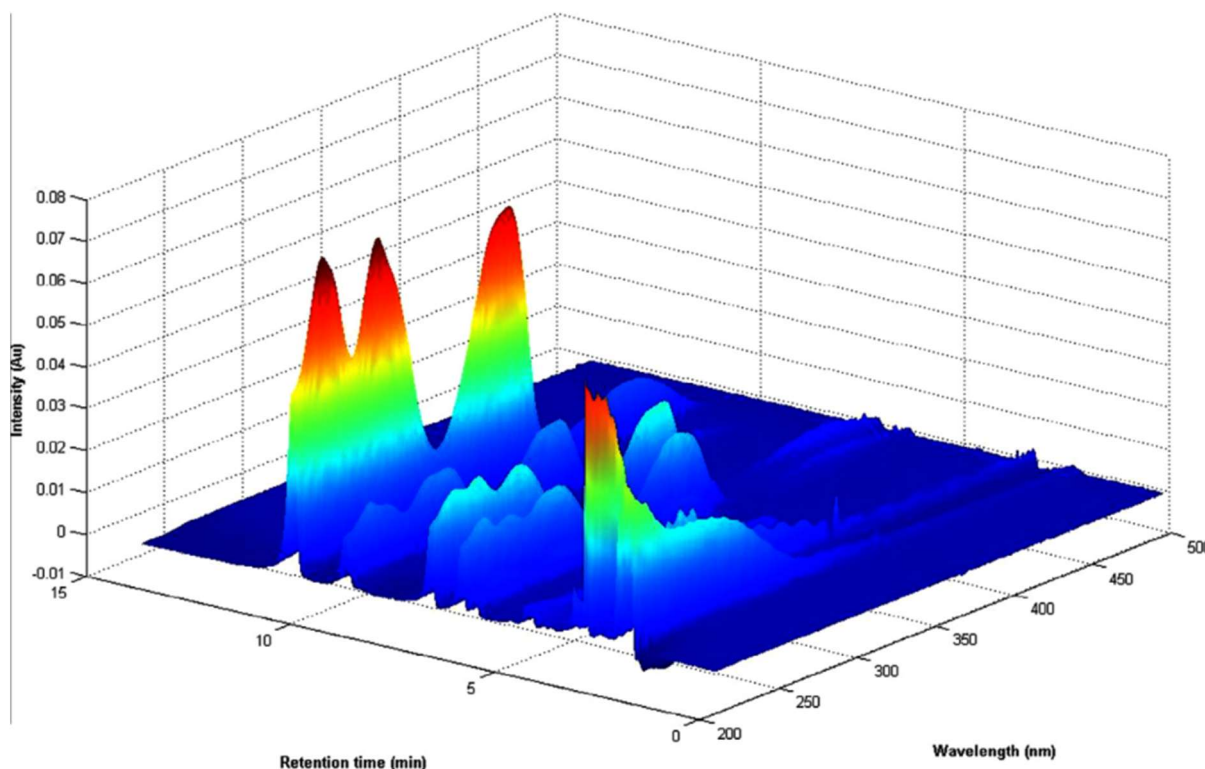
Figura 13 – Esquema de um detector de absorbância no UV/Vis



Fonte: Belmonte (2023).

Alternativo ao método fotométrico, o detector por arranjo de diodos (DAD) é capaz de monitorar todo o espectro eletromagnético à medida que os componentes da amostra atingem o sistema (Skoog *et al.*, 2006). Esse arranjo linear de fotodiodos permite a leitura de todos os λ ao mesmo tempo, logo, o espectro obtido é tridimensional (absorbância por tempo por λ), o que permite uma análise mais complexa da amostra (Figura 14).

Figura 14 – Espectro tridimensional obtido através do HPLC-DAD



Fonte: Zhai *et al.* (2014).

2.4. Validação analítica

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (p. 4):

[Validação analítica] é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidência objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

Em outras palavras, a validação tem como objetivo avaliar sistematicamente um método de análise de modo a confirmar a qualidade do mesmo, ou seja, avaliar se o método produz resultados confiáveis e condizentes com a realidade da amostra. Para que esta avaliação seja realizada, existem certos parâmetros que devem ser considerados a fim de se validar o método, e esses parâmetros variam de acordo com a matéria-prima a ser analisada. Os parâmetros estão explicitados no Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 – Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento - Dissolução (quantificação) - Uniformidade de conteúdo - Potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽¹⁾	Não	Sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não ⁽³⁾	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não ⁽³⁾
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

⁽¹⁾ Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

⁽²⁾ Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

⁽³⁾ Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: ANVISA, 2017.

Os parâmetros avaliados na metodologia proposta para a determinação de DMF em talidomida IFA foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

2.4.1. Seletividade

De acordo com a ANVISA, através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (p. 8):

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio de sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.

Portanto, o teste de seletividade tem como objetivo avaliar a capacidade do método de determinar o composto de interesse na presença de outros compostos que possam interferir nos resultados.

2.4.2. Linearidade

De acordo com a ANVISA, através da RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (p. 9):

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio de sua capacidade de obter respostas analítica diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

Portanto, o teste de linearidade tem como objetivo verificar se o resultado obtido em cada ponto de uma curva de calibração do analito corresponde proporcionalmente à sua concentração na solução.

2.4.3. Precisão

De acordo com a ANVISA, através da RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (p. 11):

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado.

Em outras palavras, o teste de precisão avalia a dispersão das respostas analíticas, verificando se múltiplas determinações independentes fornecem o mesmo resultado sob condições variadas.

2.4.4. Exatidão

De acordo com a ANVISA, através da RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (p. 13):

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.

Em outras palavras, o teste de exatidão avalia se a resposta analítica obtida é condizente com a resposta analítica esperada, ou seja, a concentração encontrada e a concentração real devem ser suficientemente próximas.

2.4.5. Limite de detecção

De acordo com a ANVISA, através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (p. 14):

Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de detecção (LD) pode ser determinado de diversas maneiras. As duas maneiras mais utilizadas são através da razão sinal/ruído (S/N) e através dos parâmetros da curva de calibração.

2.4.6. Limite de quantificação

De acordo com a ANVISA, através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (p. 15):

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação (LQ), similar ao LD, pode ser determinado de diversas maneiras. As duas maneiras mais utilizadas são através da razão sinal/ruído (S/N) e através dos parâmetros da curva de calibração.

2.4.7. Robustez

De acordo com a ANVISA, através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (p. 15):

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas.

A robustez avalia se pequenas variações aleatórias, tanto no preparo das amostras quanto na análise do equipamento, interferem significativamente na resposta analítica.

2.5. Testes Estatísticos

No contexto da validação analítica, a estatística desempenha um papel fundamental. Através dos seus testes, é possível verificar a qualidade dos resultados obtidos utilizando o método que se deseja validar.

Uma ferramenta frequentemente utilizada na estatística é o Teste de Hipóteses, onde calcula-se a probabilidade a um certo nível de significância (α) de se confirmar uma hipótese pré-determinada. A hipótese a ser testada é chamada de Hipótese Nula (H_0) e é contraposta à Hipótese Alternativa (H_1). Os valores de α comumente utilizados são 0,10, 0,05 e 0,01, que significam a probabilidade de rejeitar H_0 de 10%, 5% e 1%, respectivamente. Nos testes estatísticos, calcula-se a probabilidade de significância (p -valor) e a compara com o valor de α . Caso o p -valor seja maior do que α , H_0 não deve ser rejeitada (Snedecor; Cochran, 1989).

Os testes realizados na validação da metodologia proposta foram o teste de Shapiro-Wilk, Grubbs, Breusch-Pagan, ANOVA (*one-way*, *multi-way*, F-Snedecor e LOF) e o teste de Resíduos Padronizados de Jackknife.

2.5.1. Teste de Shapiro-Wilk

Desenvolvido em 1965 por S. S. Shapiro e M. B. Wilk, o teste de Shapiro-Wilk avalia a normalidade de um conjunto de dados. Em curvas de calibração, utilizam-se os resíduos dos dados. Esta avaliação é necessária para garantir que há correlação entre os dados observados e os valores esperados, para assim ser possível aplicar técnicas estatísticas paramétricas com maior confiança (Snedecor; Cochran, 1989). A estatística do teste W é calculada de acordo com a Equação 1:

$$W = (\sum_{i=1}^n a_i x_i)^2 / \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (1)$$

Onde:

n = número de observações;

a_i = coeficiente calculado com base na matriz de covariância;

$x_{(i)}$ = dados ordenados em ordem crescente;

$\bar{x}$ = média dos dados.

O p -valor fornece a probabilidade do W calculado ser maior do que o W crítico (de acordo com o número de observações do experimento e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual os dados seguem a distribuição normal (Shapiro; Wilk, 1965).

2.5.2. Teste de Grubbs

Desenvolvido em 1969 por F. E. Grubbs, o teste de Grubbs (ou teste G) avalia a presença de valores *outliers* (fora da curva) dentro de um grupo amostral. Em curvas de calibração, utilizam-se os resíduos para a identificação do *outlier*, avaliando o maior valor em módulo. Para a realização desse teste, é necessário que os dados sigam a distribuição normal. A estatística do teste G é calculada de acordo com a Equação 2:

$$G = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \quad (2)$$

Onde:

x_i = dado mais distante da média;

$\bar{x}$ = média do conjunto de dados;

s = desvio padrão do conjunto de dados.

O p -valor fornece a probabilidade do G calculado ser menor do que o G crítico (de acordo com o número de observações do experimento e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual o ponto da curva testado não é um ponto fora da curva (Grubbs, 1969). Caso a porcentagem de *outliers* exceda 22,2% dos dados originais, os dados devem ser descartados e um novo ensaio deve ser realizado (Horwitz, 1995).

2.5.3. Teste de Resíduos Padronizados de Jackknife

Desenvolvido em 1949 por M. H. Quenouille e posteriormente aprimorado em 1958 por J. W. Tukey, o teste de Jackknife estima a variância de um grupo amostral por reamostragem

sem reposição de dados. Em outras palavras, o teste se baseia na remoção de uma amostra do conjunto de dados, no recálculo da variância do conjunto e comparação entre os dois conjuntos de dados (Domingues *et al.*, 2015). O teste de resíduos padronizados de Jackknife utiliza essa técnica de estimação da variância por reamostragem para a identificação de *outliers* (Brown; Tauler; Walczak, 2020). A estatística do teste r_i^* é calculada de acordo com a Equação 3:

$$r_i^* = e_i / \sqrt{MSE_i(1 - h_{ii})} \quad (3)$$

Onde:

e_i = diferença entre o valor observado e o valor predito pelo modelo sem a observação;

MSE_i = erro quadrático médio do modelo sem a observação;

h_{ii} = elemento i,i da matriz H calculada a partir da matriz do modelo.

Caso o módulo do valor r_i^* referente àquela observação removida seja superior a 2,5, aquela observação é um *outlier* (Hill, 2009). Caso a porcentagem de *outliers* exceda 22,2% dos dados originais, os dados devem ser descartados e um novo ensaio deve ser realizado (Horwitz, 1995).

2.5.4. Teste de Breusch-Pagan

Desenvolvido em 1979 por T. S. Breusch e A. R. Pagan, o teste de Breusch-Pagan avalia a homogeneidade da variância (homocedasticidade) de um grupo amostral. Em curvas de calibração, utilizam-se os resíduos dos dados. Este teste é de extrema importância para demonstrar que os resultados obtidos não possuem nenhuma tendência, ou seja, seus resíduos se distribuem de maneira aleatória. A estatística do teste LM (multiplicador de Lagrange) é calculada de acordo com a Equação 4:

$$LM = \frac{1}{2} [N / n(N - n)] [\sum_{t=1}^n (\hat{u}_t^2 / \hat{\sigma}^2) - n] \quad (4)$$

Onde:

N = número total de observações;

n = subconjunto de observações;

$\hat{u}_t^2$ = resíduo ao quadrado para cada observação t ;

$\hat{\sigma}^2$ = variância estimada dos resíduos.

O p -valor fornece a probabilidade do LM calculado ser menor do que o LM crítico (de acordo com os graus de liberdade e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual os resíduos da curva construída são homocedásticos (Breusch; Pagan, 1979).

2.5.5. Teste ANOVA

A análise de variâncias (ANOVA) é uma técnica poderosa para estimar possíveis causas de variações em um grupo amostral, podendo ser utilizada de diferentes formas, como por exemplo, para distinguir variações previstas de variações aleatórias (Miller, James; Miller, Jane; Miller, Robert, 2018).

Quando o ANOVA é utilizado para comparar médias entre diferentes conjuntos de dados, essa análise é denominada *one-way* (uma via), por se tratar de apenas um fator além do fator de erro aleatório. Quando se deseja realizar a comparação de vários fatores ao mesmo tempo, é denominada *multi-way* (múltiplas vias) (Miller, James; Miller, Jane; Miller, Robert, 2018). A estatística do teste F é calculada de acordo com a Equação 5:

$$F = MS_F / MS_E \quad (5)$$

Onde:

MS_F = média quadrática do fator;

MS_E = média quadrática do erro.

O p -valor fornece a probabilidade do F calculado ser menor do que o F crítico (de acordo com os graus de liberdade de cada grupo e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual as médias dos grupos são estatisticamente equivalentes (Snedecor; Cochran, 1989).

Quando o ANOVA é utilizado para avaliar a significância da regressão linear de uma curva de calibração, essa análise é denominada F-Snedecor. A estatística do teste F é calculada da mesma maneira que a Equação 5. No teste, o F indica se a variabilidade explicada pelo modelo é maior do que a variabilidade não explicada. O p -valor fornece a probabilidade do F calculado ser menor do que o F crítico (de acordo com os graus de liberdade da regressão e dos resíduos e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual o modelo de regressão linear não explica a variabilidade dos dados (Snedecor; Cochran, 1989). Destaca-se aqui que o ANOVA

(F-Snedecor) é um dos dois únicos testes no presente trabalho cujo H_0 deve ser rejeitado, sendo o outro teste a análise do coeficiente angular da regressão linear.

Quando o ANOVA é utilizado para avaliar o ajuste linear dos dados, essa análise é denominada falta de ajuste (LOF, do inglês *lack of fit*). A estatística do teste F é calculada da mesma maneira que a Equação 5. No teste, o F indica se a variabilidade explicada pela falta de ajuste do modelo é maior do que a variabilidade do erro puro. O p -valor fornece a probabilidade do F calculado ser menor do que o F crítico (de acordo com os graus de liberdade da falta de ajuste e dos resíduos e α), o que indica a não-rejeição de H_0 , na qual o modelo linear se ajusta adequadamente aos dados (Brown; Tauler; Walczak, 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um HPLC da marca Shimadzu, com os seguintes módulos: controlador de sistema CBM-20A, sistema degaseificador em linha DGU-20A5R, módulo propulsor de solventes LC-30AD, injetor automático SIL-30AC, forno de coluna CTO-20AC e detector DAD SPD-M20A. As condições cromatográficas do equipamento estão listadas no Quadro 3. Para fins de rotina laboratorial, desejou-se usar a mesma corrida cromatográfica já realizada na determinação do teor de talidomida no IFA, logo, as condições abaixo refletem as mesmas utilizadas no doseamento, com exceção do comprimento de onda do detector, que foi selecionado especificamente para a detecção otimizada de DMF. Todas as soluções foram injetadas em monoplicata.

Quadro 3 – Condições de análise

Coluna	C18 (150 mm × 3,9 mm × 4,0 μm)
Temperatura da Coluna	25 °C
Detector	UV/Vis em 200 nm
Fluxo de FM	1,0 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	30 minutos
Volume de injeção	20 μL
Composição da FM	Água : acetonitrila : ácido fosfórico PA (85:15:0,1)

Fonte: Funed, 2022.

3.2. Reagentes utilizados

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido fosfórico grau HPLC (Supelco Lote BCKK4957), ácido fosfórico grau PA (Anidrol Lote 56.031-1), acetonitrila grau HPLC (Biograde Lote 2400012634), fenacetina grau HPLC (Sigma-Aldrich Lote WXBD2199V), metanol grau HPLC (Merck Lote I1263607), Padrão de Trabalho de talidomida (Funed Lote MP2023030019) e Substância Química de Referência Caracterizada (SQC) N,N-Dimetilformamida (Sigma-Aldrich Lote STBK2956). A água ultrapurificada foi obtida através do sistema de purificação de água Millipore Integral A-10, localizado no SCFQ.

3.3. Preparo das soluções utilizadas

Como dito anteriormente, deseja-se usar a mesma corrida cromatográfica já realizada na determinação do teor de talidomida no IFA. Parte das soluções abaixo já são utilizadas nesta análise. O ácido fosfórico serve para tamponar a solução e estabilizar a talidomida, uma vez que o seu tempo de retenção tende a variar em função do pH tanto da solução quanto da FM. A fenacetina é utilizada com padrão interno.

3.3.1. Solução de ácido fosfórico 1% (V V⁻¹)

- Em um balão volumétrico de 100,0 mL, adicionar cerca de $\frac{3}{4}$ do volume de água ultrapurificada;
- Adicionar ao balão 1,00 mL de ácido fosfórico PA, utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar.

3.3.2. Solução padrão de fenacetina

- Medir exatamente cerca de 75,0 mg de fenacetina em papel vegetal, utilizando balança analítica;
- Transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 50,00 mL, com auxílio de 40 mL de acetonitrila, medidos em proveta e homogeneizar;
- Colocar em banho de ultrassom por 10 minutos ou até completa solubilização da fenacetina;

- Completar o volume do balão com acetonitrila e homogeneizar.

Concentração aproximada de fenacetina: 1,50 mg mL⁻¹.

3.3.3. Solução padrão de talidomida

- Medir exatamente cerca de 50,0 mg de talidomida em papel vegetal, utilizando balança analítica;
- Transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 50,00 mL, com auxílio de 40 mL de acetonitrila, medidos em proveta e homogeneizar;
- Colocar em banho de ultrassom por 10 minutos ou até completa solubilização da talidomida;
- Completar o volume do balão com acetonitrila e homogeneizar.

Concentração aproximada de talidomida: 1,00 mg mL⁻¹.

3.3.4. Solução padrão estoque de DMF

- Em um balão volumétrico de 10,00 mL, adicionar cerca de 5 mL de acetonitrila, medidos em proveta;
- Pesar o balão com acetonitrila e registrar a massa;
- Adicionar ao balão 200,0 µL de SQC DMF com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Pesar novamente o balão e registrar a massa;
- Completar o volume do balão com acetonitrila e homogeneizar;
- Calcular a alíquota necessária para a diluição de acordo com a Equação 6:

$$A = \frac{56880}{B_P - B_V} \quad (6)$$

Onde:

A = Alíquota a ser pipetada em µL;

B_V = Massa do balão antes da adição de DMF em mg;

B_P = Massa do balão após adição de DMF em mg;

- Pipetar a alíquota calculada para um balão volumétrico de 10,00 mL;
- Completar o volume do balão com acetonitrila e homogeneizar;

- Pipetar 200,0 μL da solução anterior para um balão volumétrico de 10,00 mL;
- Completar o volume do balão com acetonitrila e homogeneizar.

Concentração aproximada de DMF: 11,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.5. Soluções da curva de calibração

O preparo das soluções está descrito nos próximos subtópicos. A Tabela 1 indica os volumes pipetados da solução padrão estoque de DMF e as concentrações aproximadas por nível.

Tabela 1 – Volumes pipetados e concentrações aproximadas por nível

Nível	Volume pipetado (μL)	Concentração alvo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	200,0	0,0228
2	400,0	0,0455
3	600,0	0,0683
4	800,0	0,0910
5	1000,0	0,1138

Fonte: Autoria própria (2024).

3.3.5.1. Soluções de nível 1

- Pipetar 200,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 9,8 mL de acetonitrila, com o auxílio de pipeta graduada;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

3.3.5.2. Soluções de nível 2

- Pipetar 400,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 9,6 mL de acetonitrila, com o auxílio de pipeta graduada;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

3.3.5.3. Soluções de nível 3

- Pipetar 600,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 9,4 mL de acetonitrila, com o auxílio de pipeta graduada;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

3.3.5.4. Soluções de nível 4

- Pipetar 800,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 9,2 mL de acetonitrila, com o auxílio de pipeta graduada;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

3.3.5.5. Soluções de nível 5

- Pipetar 1000,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 9,0 mL de acetonitrila, com o auxílio de pipeta graduada;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

3.3.6. Solução limite de DMF

- Pipetar 774,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
 - Adicionar 15,00 mL de acetonitrila, utilizando pipeta volumétrica;
 - Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
 - Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
 - Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .
- Concentração aproximada de DMF: 0,0880 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.7. Solução limite de DMF contendo matriz

- Pipetar 774,0 μL da solução padrão estoque de DMF para um balão de 100,0 mL, com o auxílio de pipeta de volume variável;
- Adicionar 10,00 mL da solução padrão de talidomida, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 5,00 mL da solução padrão de fenacetina, utilizando pipeta volumétrica;
- Adicionar 10,00 mL da solução de ácido fosfórico 1% (V V^{-1}), utilizando pipeta volumétrica;
- Completar o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizar;
- Filtrar para *vial* utilizando unidade filtrante de PVDF com porosidade de 0,45 μm .

Concentração aproximada de DMF: 0,0880 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração aproximada de talidomida: 0,100 mg mL^{-1} .

Concentração aproximada de fenacetina: 0,0750 mg mL^{-1} .

3.4. Testes preliminares

Antes de iniciar os testes da validação analítica, foram realizados testes preliminares a fim de se atestar a possibilidade de sucesso da validação nesses parâmetros. Foram construídas oito curvas de calibração a fim de se atestar a linearidade das áreas em diferentes λ e concentrações.

3.5. Validação analítica

Abaixo estão descritas as análises que foram realizadas, conforme RDC nº 166/2017 e o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO, 2020). As análises estatísticas foram realizadas através do *software* R, cujo script consta no Apêndice A. Em todos os testes estatísticos, foi utilizado $\alpha = 0,05$ (95% de confiança).

3.5.1. Análise da seletividade

Esta etapa pode ser realizada de diversas maneiras, a depender da amostra a ser analisada. Uma das maneiras é realizar a comparação da matriz da análise isenta do analito com a matriz contendo o analito em concentração conhecida (padrão). Neste caso, nenhum composto da matriz isenta deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito no matriz padrão, demonstrando que a resposta analítica naquele tempo se deve exclusivamente ao analito. De maneira semelhante, também é possível atestar a seletividade do método comparando a área do pico de uma solução da amostra com a área do pico de uma solução padrão, onde a diferença da área indica a presença de outros compostos no mesmo tempo de retenção (Moreira, 2015).

Na presente monografia, optou-se por realizar o preparo de cinco soluções: uma solução em branco, contendo apenas água, acetonitrila e ácido fosfórico; uma solução de DMF na concentração limite da matéria-prima (0,0880 $\mu\text{g mL}^{-1}$); uma solução de DMF na concentração limite da matéria-prima contendo talidomida; uma solução de DMF na concentração limite da

matéria-prima contendo fenacetina e; uma solução de DMF na concentração limite da matéria-prima contendo a matriz completa (talidomida e fenacetina). A finalidade desta metodologia é avaliar se a área do pico de DMF sofre variações de acordo com os compostos presentes na solução. Através do *software* R, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, Grubbs e ANOVA (*one-way*).

3.5.2. Análise da linearidade

Para a realização deste teste, é necessário realizar o preparo de, no mínimo, três curvas de calibração independentes com três níveis de concentração igualmente espaçados, onde idealmente o nível intermediário esteja próximo da concentração limite do analito na solução da amostra, em casos de quantificação.

Na presente monografia, optou-se por realizar o preparo de dez curvas de calibração (cinco com apenas DMF e cinco contendo DMF e talidomida), com cinco níveis igualmente espaçados. As soluções foram injetadas em ordem aleatória no HPLC a fim de se evitar que flutuações do instrumento ou efeitos de memória da coluna cromatográfica interfiram na obtenção dos resultados.

Através do *software* R, foram analisados os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), que devem ser maiores que 0,990 e 0,980, respectivamente. Foi analisado também o coeficiente angular, que deve ser significativamente diferente de zero a 95% de confiança. Além disso, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, Resíduos Padronizados de Jackknife, Breusch-Pagan e ANOVA (F-Snedecor e LOF).

3.5.3. Análise da precisão

A precisão deve ser realizada em duas etapas: precisão por repetibilidade e precisão intermediária. A etapa de repetibilidade é realizada por um analista, em um dia, utilizando um equipamento e uma corrida analítica. Deve-se preparar, no mínimo, nove soluções que contemplem a faixa de trabalho determinada pela etapa de linearidade. Mais especificamente, deve-se preparar três concentrações distintas com três replicatas em cada nível e o desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas dos picos do analito deve estar abaixo de um valor pré-determinado.

A etapa de precisão intermediária é realizada por um segundo analista, em um segundo dia. O segundo analista deve seguir as mesmas etapas de preparo de solução que o primeiro analista, e os cálculos devem ser os mesmos. Esta etapa avalia a concordância dos resultados frente a diversas variações aleatórias.

Na presente monografia, optou-se por preparar quinze soluções, ou seja, três concentrações com cinco replicatas em cada nível. As concentrações das soluções preparadas correspondem aos níveis 2, 3 e 4 das curvas de calibração (0,0455, 0,0683 e 0,0910 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Através do *software* R, foi analisado o DPR entre as áreas dos picos de DMF nos cromatogramas, não podendo ser superior a 5,3% (AOAC, 2012). Além disso, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk e Grubbs.

3.5.4. Análise da exatidão

Para a realização da exatidão, deve-se preparar quinze soluções que contemplem a faixa de trabalho determinada pela etapa de linearidade, como na etapa de precisão, ou apenas utilizar os resultados obtidos pelo próprio teste. A partir dos dados, a concentração deve ser calculada a fim de se comparar com a concentração teórica, sendo esta análise denominada recuperação, que deve estar dentro de uma faixa aceitável pré-determinada.

Na presente monografia, foram utilizados os resultados obtidos dos testes da etapa de precisão. Adicionalmente, foi realizado o teste de Breusch-Pagan e foi calculada a recuperação, que deve se situar entre 90 e 107% (AOAC, 2012).

3.5.5. Análise do limite de detecção

Para calcular o LD, foram utilizados os resultados obtidos no teste linearidade. O valor foi obtido através do desvio padrão dos interceptos do eixo Y das curvas de calibração do teste de linearidade. O LD foi calculado utilizando a Equação 7 a seguir.

$$LD = \frac{D_{PA} \times 3,3}{IC} \quad (7)$$

Onde:

LD = limite de detecção;

D_{PA} = desvio padrão dos interceptos da curva de linearidade;

IC = inclinação da curva de linearidade.

3.5.6. Análise do limite de quantificação

De modo análogo ao LD, o LQ foi calculado utilizando a Equação 8 a seguir.

$$LQ = \frac{D_{PA} \times 10}{IC} \quad (8)$$

Onde:

LQ = limite de quantificação;

D_{PA} = desvio padrão dos interceptos da curva de linearidade;

IC = inclinação da curva de linearidade.

3.5.7. Análise da robustez

Na presente monografia, utilizou-se a metodologia de Youden e Steiner, onde são alteradas sete variáveis por meio de oito análises, em duplicatas, em uma combinação fatorial a fim de se observar a influência de cada variável na análise (Youden; Steiner, 1975, *apud* César; Pianetti, 2009)². Os níveis das variáveis por análise estão descritos na Tabela 2 e as variáveis estão descritas no Quadro 4. Através do *software* R, foi realizado o teste ANOVA (*multi-way*).

² YODEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC – Association of the Official Analytical Chemists**. AOAC-I, Washington DC, 1975. 88 p.

Tabela 2 – Nível das variáveis por análise

Variável	Análise							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: Autoria própria (2024).

Quadro 4 – Variáveis e seus limites

Variável		Limites superior e inferior
A	Temperatura da coluna	A: 25 °C a: 22 °C
B	Fluxo da fase móvel	B: 1,0 mL min ⁻¹ b: 0,8 mL min ⁻¹
C	Integração do pico	C: Automática c: Manual
D	Comprimento de onda de detecção	D: 215 nm d: 200 nm
E	Grau do ácido fosfórico	E: Grau HPLC e: Grau PA
F	Volume de injeção	F: 25 µL f: 20 µL
G	Período de estabilidade da amostra	G: Um dia de distância g: Injeção imediata

Fonte: Autoria própria (2024).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes preliminares

A primeira curva de calibração foi utilizada para verificar o λ ideal de análise, cujas concentrações variam de maneira uniforme entre 0,569 e 1,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados se mostraram satisfatórios na maioria as faixas analisadas, sendo em 215 nm o λ que melhor se ajustou ao DMF. Na Tabela 3 consta os resultados do r^2 por λ .

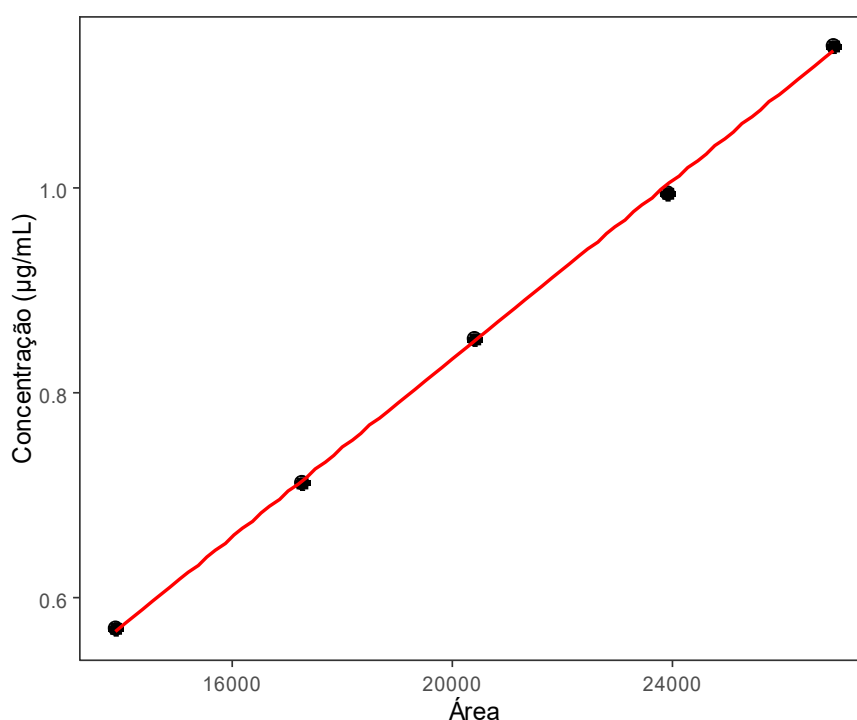
Tabela 3 – Coeficientes de correlação em função do comprimento de onda

λ (nm)	190	195	200	205	210	215	220	225
r^2	0,8079	0,9556	0,9535	0,9843	0,9918	0,9995	0,9745	0,9150

Fonte: Autoria própria (2024).

Como observado, o valor de r^2 em 215 nm de 0,9995 demonstra que a área do pico de DMF se comporta de maneira proporcional à concentração do composto, logo, este λ se mostrou ideal para esta análise. A regressão linear da curva está representada na Figura 15.

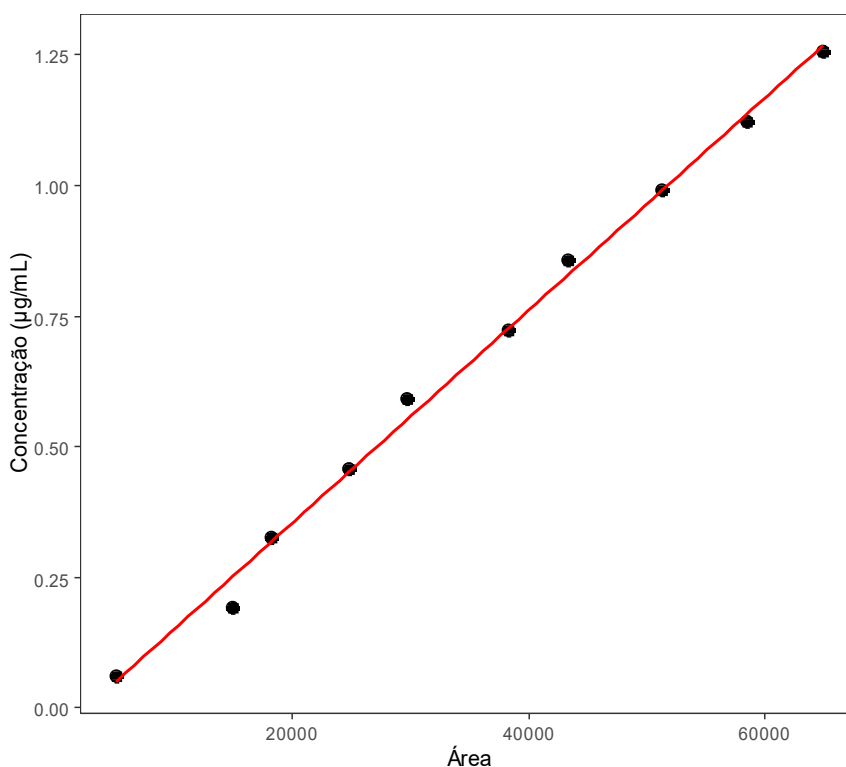
Figura 15 – Curva de calibração preliminar para avaliação do comprimento de onda



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2024).

Já a segunda curva foi construída com dez pontos, com as concentrações variando de maneira uniforme entre 0,0591 e 1,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a fim de se atestar a linearidade da faixa de trabalho. O r^2 obtido foi de 0,9958, demonstrando que mesmo para concentrações mais baixas, a proporcionalidade entre a concentração e a área do pico se manteve. A regressão linear da curva está representada na Figura 16.

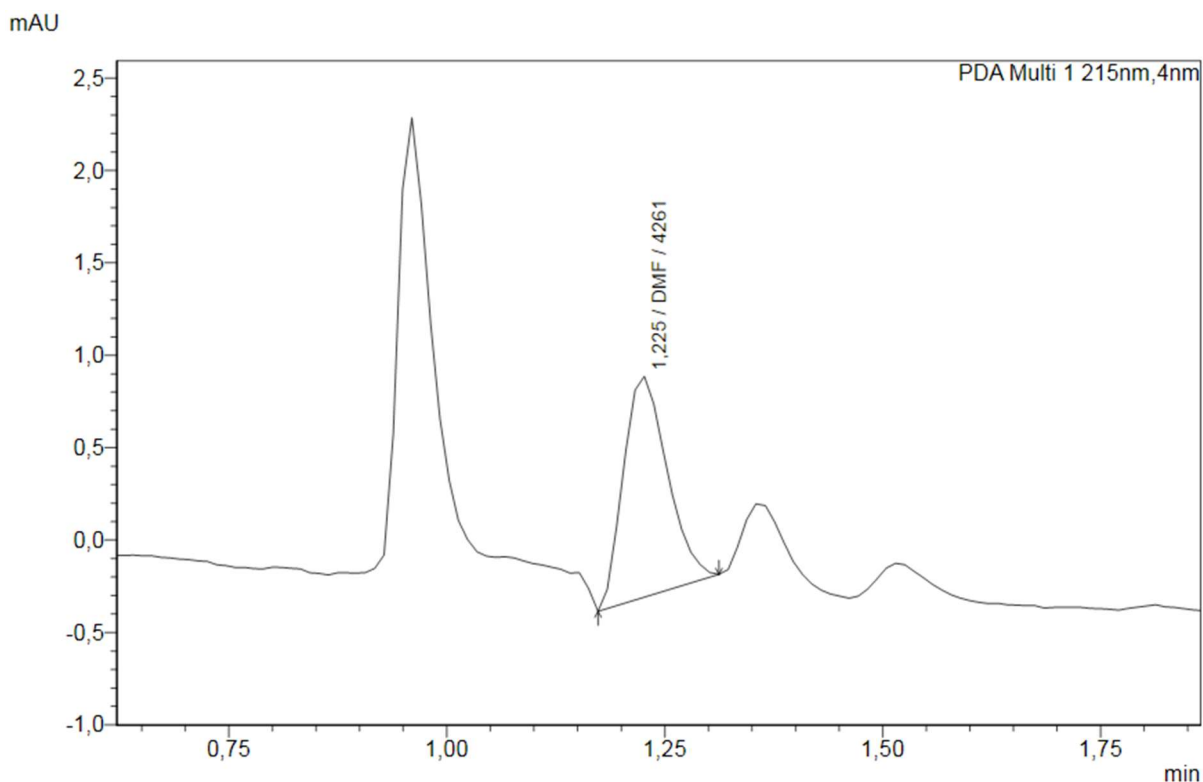
Figura 16 – Curva de calibração preliminar para avaliação da faixa de trabalho



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2024).

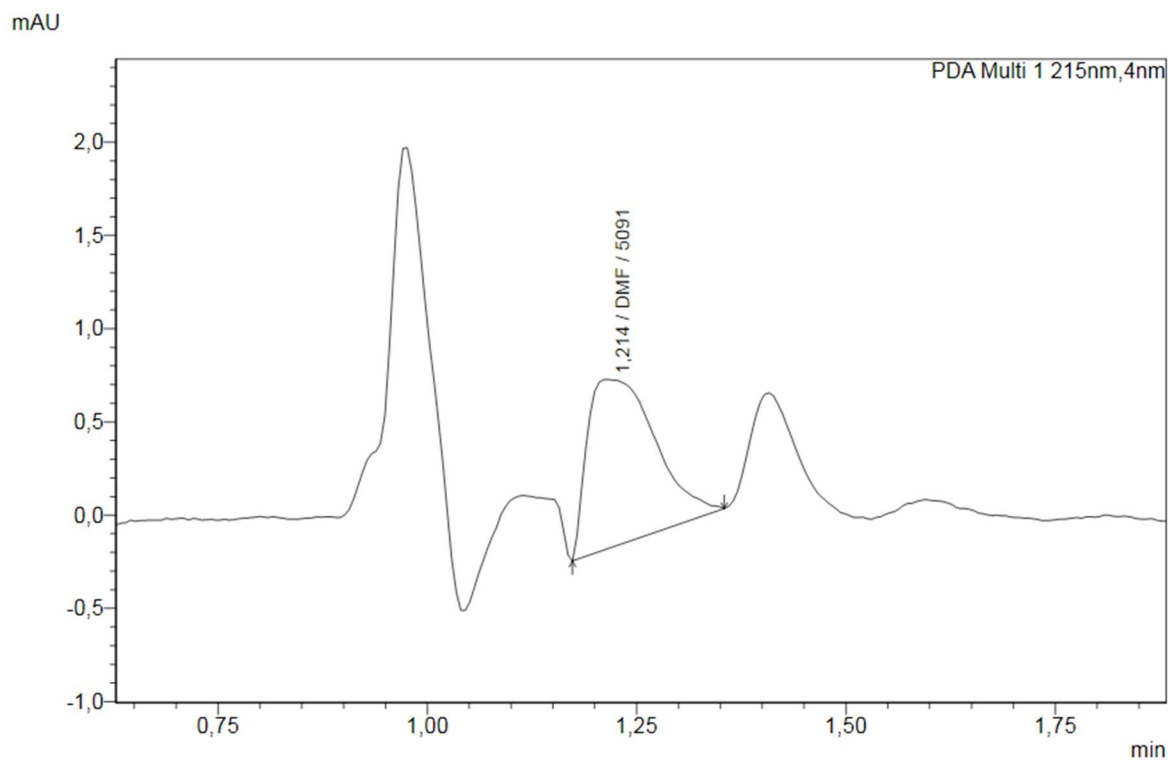
Foi notado que nos cromatogramas da curva (Figura 17), há uma leve depressão imediatamente antes do pico de DMF, o que interfere na área obtida. Essa depressão pode ser causada pelo ruído inerente ao equipamento ou pela redução da eficiência da coluna cromatográfica. Nota-se também que o topo do pico apresentou um *plateau*, que também interfere no cálculo da área. Para contornar tal problema, a taxa de amostragem do método foi aumentada, de 1,5625 para 3,125 Hz. Ou seja, dobrou-se o número de pontos registrados por segundo com o intuito de suavizar o pico (Figura 18) e garantir valores de área mais consistentes.

Figura 17 – Cromatograma do pico de DMF antes do ajuste de taxa de amostragem



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2024).

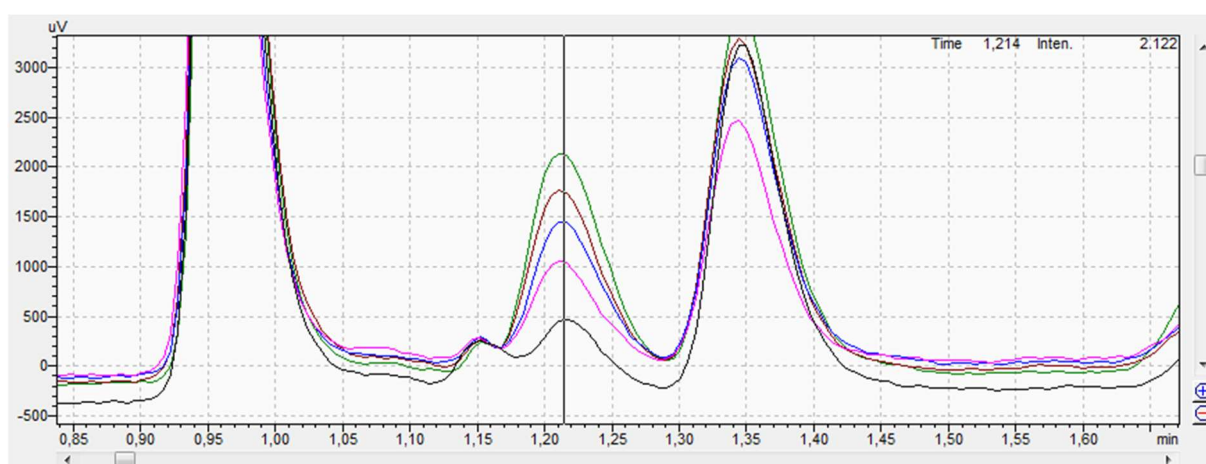
Figura 18 – Cromatograma do pico de DMF depois do ajuste de taxa de amostragem



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2024).

Ao se utilizar uma coluna cromatográfica C18 de fase reversa, cuja FE é composta por grupos octadecil suportados em sílica, para a determinação de compostos polares, como o DMF, a tendência é que o tempo de retenção seja muito baixo, devido às poucas interações que as moléculas do analito irão realizar ao longo da corrida cromatográfica. O número de pratos teóricos (NPT) dos picos das Figuras 17 e 18 foram respectivamente 2114 e 1196, valores considerados baixos. No caso do DMF, o tempo médio de retenção obtido foi de 1,22 s, com o seu pico se localizando muito próximo do tempo de volume morto, que é o tempo necessário para o detector receber as flutuações geradas pela injeção da amostra no fluxo da FM. Essas flutuações geram os picos adjacentes ao pico de DMF, que pode ser facilmente confundido. A maneira mais efetiva de se identificar corretamente o pico é através da sobreposição dos cromatogramas da curva de calibração, o que permite visualizar a progressão da altura do pico (Figura 19).

Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos de picos de DMF da curva de calibração



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2024).

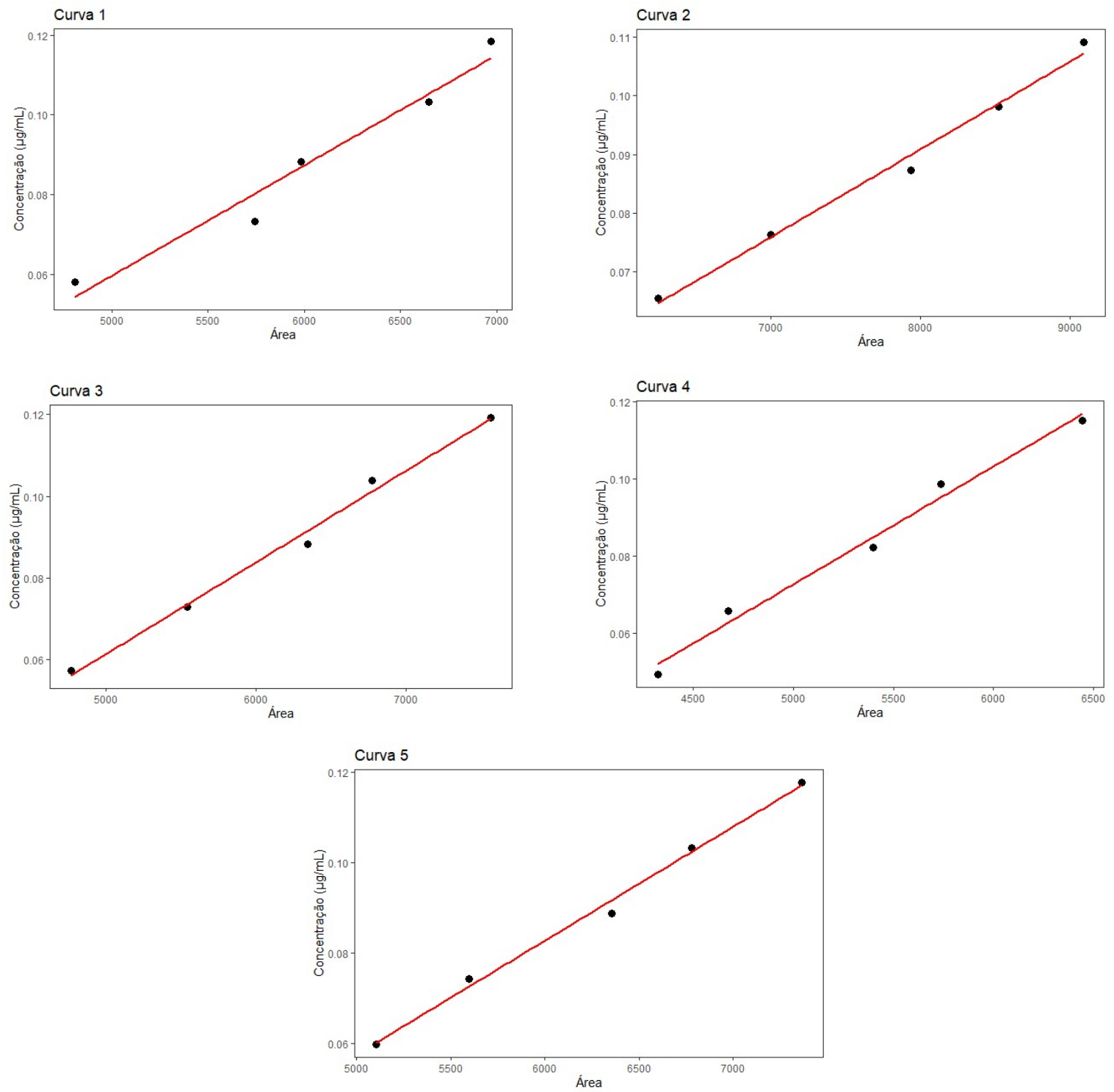
A partir do resultado positivo da curva, foram construídas cinco curvas de calibração independentes com concentrações variadas a fim de se atestar a repetibilidade dos resultados. Os valores de r^2 estão representados na Tabela 4, enquanto as curvas podem ser visualizadas na Figura 20.

Tabela 4 – Coeficientes de determinação das curvas preliminares

Curva	1	2	3	4	5
r^2	0,9618	0,9901	0,9918	0,9856	0,9943

Fonte: Autoria própria (2024).

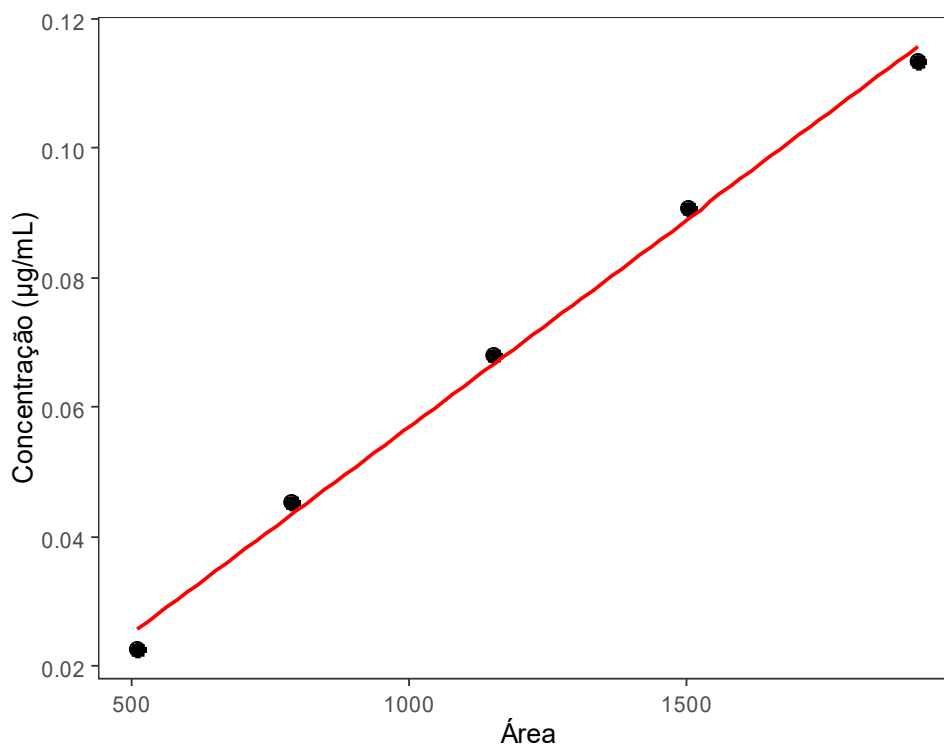
Figura 20 – Curvas de calibração preliminares para avaliação da repetibilidade



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2024).

Os valores altos de r^2 demonstram que de fato existe linearidade na análise na faixa de trabalho. Por fim, uma última curva foi construída englobando a concentração limite de DMF ($0,0880 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o limite estimado pelas curvas anteriores ($0,0308 \mu\text{g mL}^{-1}$). A curva está representada na Figura 21.

Figura 21 – Curva de calibração preliminar final



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2024).

Com o r^2 de 0,9957, constatou-se que as áreas do pico de DMF na faixa de trabalho estabelecida seguem uma linearidade bem definida, indicando a possibilidade de validação do método.

4.2. Seletividade

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se a área correspondente ao pico de DMF. Os resultados estão descritos na Tabela 5. Prosseguiu-se para avaliação estatística dos dados, os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 5 – Resultados obtidos no teste de seletividade

Solução	Replicata	Área	Tempo de retenção (min)
Branco	1	61	1,216
	2	0	1,216
	3	241	1,211
DMF	1	5903	1,233
	2	6160	1,232
	3	6084	1,231
DMF com talidomida	1	5880	1,231
	2	6125	1,227
	3	6089	1,231
DMF com fenacetina	1	6784	1,234
	2	6359	1,230
	3	6128	1,229
DMF com matriz	1	6208	1,230
	2	6255	1,231
	3	6133	1,229

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 6 – Análises estatísticas do teste de seletividade

Teste	Solução	Critério de aceitação	<i>p</i> -Valor
Shapiro-Wilk	Branco	> 0,05 (95% de confiança)	0,4696
	DMF		0,5576
	DMF com talidomida		0,2607
	DMF com fenacetina		0,6770
	DMF com matriz		0,7484
Grubbs	Branco	> 0,05 (95% de confiança)	0,2348
	DMF		0,2788
	DMF com talidomida		0,1303
	DMF com fenacetina		0,3385
	DMF com matriz		0,3742

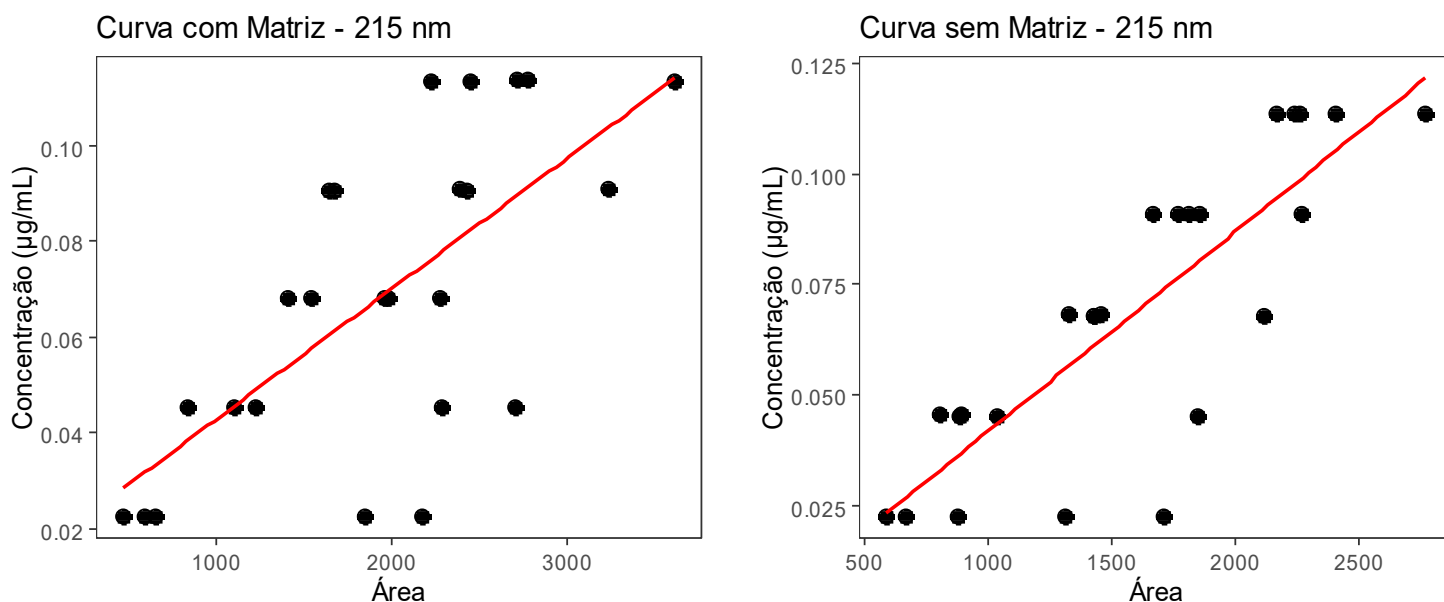
Fonte: Autoria própria (2025).

A área obtida na solução em branco diz respeito às flutuações provenientes do tempo de volume morto, sendo considerada um ruído inerente à técnica. Os p -valores dos testes de Shapiro-Wilk e Grubbs demonstraram respectivamente a normalidade dos dados e a ausência de valores anômalos. Em seguida, realizou-se o teste ANOVA (*one-way*) para avaliação da média das áreas entre as soluções com DMF, obtendo-se um p -valor de 0,1205. O p -valor deste teste ser maior do que 0,05 implica na não-rejeição de H_0 , ou seja, as médias das áreas das soluções são estatisticamente equivalentes. Através deste teste, observa-se que a presença dos compostos utilizados na análise do teor do IFA não impacta na área do pico cromatográfico de DMF.

4.3. Linearidade

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se a área correspondente ao pico de DMF. Os resultados das curvas contendo a matriz estão descritos na Tabela 7, enquanto os resultados das curvas sem matriz estão descritos na Tabela 8. Os gráficos dos dados estão representados na Figura 22.

Figura 22 – Curvas de calibração em 215 nm do teste de linearidade



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2025).

Tabela 7 – Resultados obtidos nas curvas com matriz no teste de linearidade (215 nm)

Curva	Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2
1	1	468	0,0227	0,8606
	2	1104	0,0454	
	3	1963	0,0681	
	4	1644	0,0908	
	5	2446	0,1135	
2	1	1850	0,0227	0,3726
	2	2291	0,0455	
	3	1407	0,0682	
	4	3237	0,0910	
	5	2776	0,1137	
3	1	644	0,0227	0,3030
	2	2704	0,0454	
	3	1536	0,0681	
	4	2429	0,0908	
	5	2222	0,1135	
4	1	585	0,0227	0,7988
	2	837	0,0454	
	3	2282	0,0681	
	4	1668	0,0908	
	5	3617	0,1136	
5	1	2171	0,0227	0,4047
	2	1217	0,0455	
	3	1981	0,0682	
	4	2385	0,0910	
	5	2717	0,1137	

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 8 – Resultados obtidos nas curvas sem matriz no teste de linearidade (215 nm)

Curva	Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2
1	1	877	0,0227	0,9800
	2	1038	0,0454	
	3	1427	0,0681	
	4	1857	0,0908	
	5	2257	0,1135	
2	1	1314	0,0227	0,7301
	2	895	0,0455	
	3	1456	0,0682	
	4	1767	0,0910	
	5	2238	0,1137	
3	1	588	0,0227	0,9895
	2	886	0,0454	
	3	1429	0,0681	
	4	1809	0,0908	
	5	2403	0,1135	
4	1	1709	0,0227	0,9432
	2	1846	0,0454	
	3	2113	0,0681	
	4	2266	0,0908	
	5	2768	0,1136	
5	1	670	0,0227	0,9751
	2	808	0,0455	
	3	1326	0,0682	
	4	1668	0,0910	
	5	2168	0,1137	

Fonte: Autoria própria (2025).

Como é possível observar pelos r^2 e pelos dados plotados na Figura 22 (página 41), os resultados obtidos se apresentaram de forma aleatória, sem que nenhum padrão possa ser identificado. Diante disso, analisou-se diferentes comprimentos de onda a fim de se obter

resultados mais coerentes com o esperado. O λ foi definido como 200 nm e as análises foram realizadas. As áreas utilizadas estão representadas nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Resultados obtidos nas curvas com matriz no teste de linearidade (200 nm)

Curva	Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2
1	1	1031	0,0227	0,9753
	2	1816	0,0454	
	3	3574	0,0681	
	4	4048	0,0908	
	5	5207	0,1135	
2	1	1510	0,0227	0,9909
	2	2665	0,0455	
	3	3369	0,0682	
	4	4871	0,0910	
	5	5903	0,1137	
3	1	1239	0,0227	0,9237
	2	3389	0,0454	
	3	3438	0,0681	
	4	4990	0,0908	
	5	5539	0,1135	
4	1	1519	0,0227	0,9745
	2	2287	0,0454	
	3	4015	0,0681	
	4	4988	0,0908	
	5	7188	0,1136	
5	1	2150	0,0227	0,9174
	2	2259	0,0455	
	3	4611	0,0682	
	4	4805	0,0910	
	5	6083	0,1137	

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 10 – Resultados obtidos nas curvas sem matriz no teste de linearidade (200 nm)

Curva	Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2
1	1	967	0,0227	0,9598
	2	1866	0,0454	
	3	3942	0,0681	
	4	4142	0,0908	
	5	5642	0,1135	
2	1	1090	0,0227	0,9644
	2	2140	0,0455	
	3	3289	0,0682	
	4	4266	0,0910	
	5	6624	0,1137	
3	1	853	0,0227	0,9984
	2	2076	0,0454	
	3	3240	0,0681	
	4	4232	0,0908	
	5	5308	0,1135	
4	1	1717	0,0227	0,9936
	2	2732	0,0454	
	3	3542	0,0681	
	4	4648	0,0908	
	5	5932	0,1136	
5	1	1087	0,0227	0,9630
	2	2000	0,0455	
	3	4001	0,0682	
	4	4437	0,0910	
	5	5472	0,1137	

Fonte: Autoria própria (2025).

Em posse dos resultados, é possível visualizar que a variação das áreas entre os níveis das curvas ainda se encontra alta. Essa alta variação pode ser resultado das pequenas áreas obtidas como sinal de DMF, sendo que qualquer flutuação nessa faixa é significativa em termos

percentuais. Isso pode ser conferido analisando o DPR entre os níveis das curvas (Tabela 11), que apresentaram melhores resultados em áreas maiores.

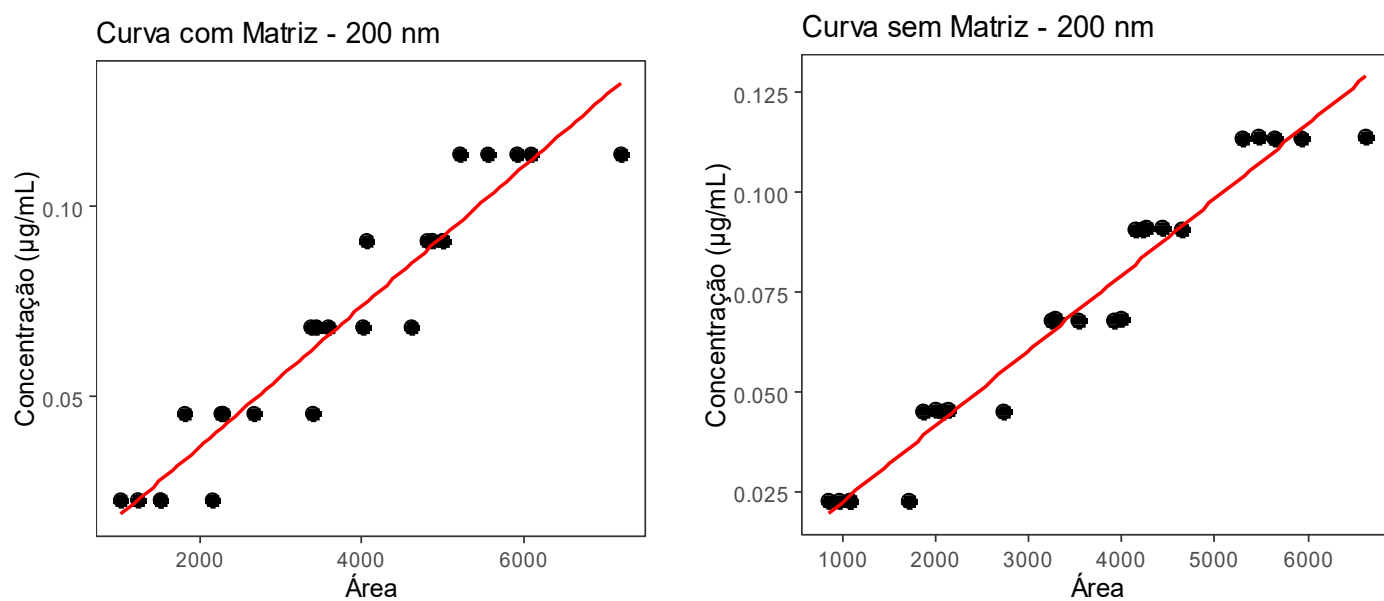
Tabela 11 – Resultados de DPR dos níveis das curvas de calibração

Nível	1	2	3	4	5
DPR (%)	30,62	20,75	11,64	7,96	10,48

Fonte: Autoria própria (2025).

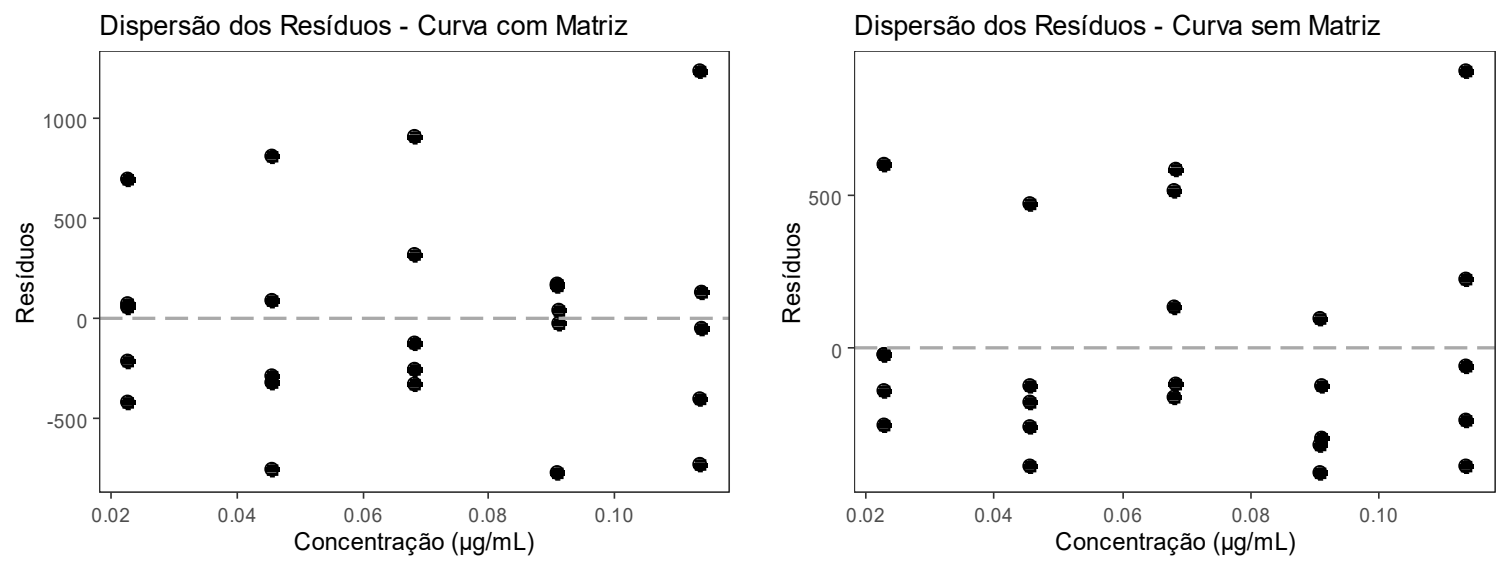
Ambas as curvas estão representadas na Figura 23 e os seus resíduos na Figura 24. Utilizando os dados obtidos, procedeu-se para as análises estatísticas. Os valores calculados estão descritos nas Tabelas 12 e 13.

Figura 23 – Curvas de calibração em 200 nm do teste de linearidade



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2025).

Figura 24 – Resíduos das curvas em 200 nm do teste de linearidade



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2025).

Tabela 12 – Análises estatísticas das curvas com matriz do teste de linearidade

Teste	Critério de aceitação	Valor
Shapiro-Wilk	> 0,05 (95% de confiança)	0,1284
Resíduos Padronizados de Jackknife	< 2,5	2,306
Breusch-Pagan	> 0,05 (95% de confiança)	0,2161
ANOVA (F-Snedecor)	< 0,05 (95% de confiança)	1,441 x10 ⁻¹³
ANOVA (LOF)	> 0,05 (95% de confiança)	0,9237
Coefficiente Angular	< 0,05 (95% de confiança)	1,441 x10 ⁻¹³
Coefficiente de Correlação (r)	> 0,990	0,9544
Coefficiente de Determinação (r²)	> 0,980	0,9109

Fonte: Autoria própria (2025).

Apesar da aprovação dos dados das curvas com matriz nos testes estatísticos, a falta de ajuste das respostas obtidas se reflete no r e no r^2 , cujo desempenhos se encontram abaixo do critério de aceitação. Esses resultados, aliados ao gráfico de resíduos da regressão linear (Figura 24, página 47), demonstram que os dados estão distribuídos de forma uniforme ao longo da curva de calibração.

Tabela 13 – Análises estatísticas das curvas sem matriz do teste de linearidade

Teste	Critério de aceitação	p -Valor
Shapiro-Wilk	$> 0,05$ (95% de confiança)	0,02506

Fonte: Autoria própria (2025).

A curva de calibração sem matriz rejeitou H_0 no teste de Shapiro-Wilk, o que significa que os resíduos da curva não seguem a distribuição normal, podendo ser observado pelo gráfico de resíduos (Figura 24, página 47). Isso implica na impossibilidade de prosseguir com as análises estatísticas, pois estes consideram que os resíduos seguem a distribuição normal. Como observado, os resultados obtidos em ambas as curvas foram insuficientes para serem aprovados no teste de linearidade.

4.4. Precisão e exatidão

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se a área correspondente ao pico de DMF. Os resultados para o Analista 1 estão descritos nas Tabelas 14 e 15, enquanto para o Analista 2 estão descritos nas Tabelas 16 e 17. As curvas de calibração obtidas por ambos os analistas estão representadas na Figura 25. Prosseguiu-se para avaliação estatística dos dados, os resultados estão descritos na Tabela 18.

Tabela 14 – Resultados obtidos pelo Analista 1 no teste de precisão

Nível	Replicata	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
1	1	2078	0,0454	12,63
	2	1689		
	3	2237		
	4	1732		
	5	2146		
2	1	2698	0,0682	3,61
	2	2445		
	3	2525		
	4	2570		
	5	2538		
3	1	3479	0,0909	1,55
	2	3472		
	3	3385		
	4	3361		
	5	3401		

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 15 – Curva de calibração obtida pelo Analista 1 no teste de precisão

Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Shapiro- Wilk	Grubbs	Breusch- Pagan	r^2
1	770	0,0227	0,1623	0,2820	0,8714	0,8970
2	2918	0,0454				
3	3571	0,0682				
4	3959	0,0909				
5	4828	0,1136				

Fonte: Autoria própria (2025).

Como foi possível observar, o DPR das áreas obtidas pelo Analista 1 no nível 1 não atendeu ao critério estabelecido, sendo superior a 5,3%. Ao mesmo tempo, a curva de calibração obteve um r^2 de 0,8970, valor abaixo do critério estabelecido de 0,980.

Tabela 16 – Resultados obtidos pelo Analista 2 no teste de precisão

Nível	Replicata	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
1	1	2677	0,0454	4,59
	2	2770		
	3	2511		
	4	2680		
	5	2841		
2	1	3865	0,0682	5,46
	2	3715		
	3	4243		
	4	4176		
	5	4052		
3	1	5197	0,0909	4,89
	2	5186		
	3	5097		
	4	5449		
	5	4753		

Fonte: Autoria própria (2025).

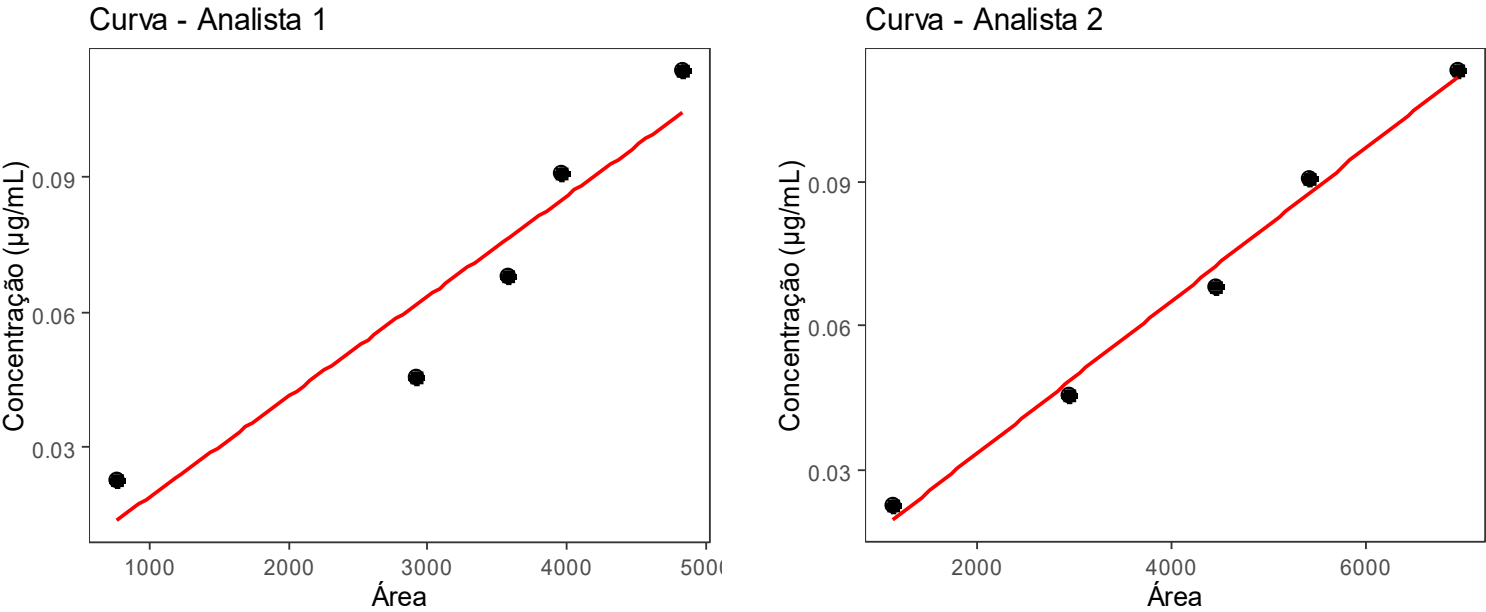
Tabela 17 – Curva de calibração obtida pelo Analista 2 no teste de precisão

Nível	Área	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Shapiro-Wilk	Grubbs	Breusch-Pagan	r^2
1	1129	0,0227	0,2221	0,4846	0,7047	0,9909
2	2942	0,0454				
3	4444	0,0681				
4	5425	0,0908				
5	6949	0,1135				

Fonte: Autoria própria (2025).

Como foi possível observar, o DPR das áreas obtidas pelo Analista 2 no nível 2 não atendeu ao critério estabelecido, sendo ligeiramente superior a 5,3%. Também é possível observar que a curva do Analista 2 foi obtida de maneira exitosa, sendo aprovada em todos os parâmetros estabelecidos.

Figura 25 – Curvas de calibração obtidas pelos analistas no teste de precisão



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* R (2025).

Tabela 18 – Análises estatísticas do teste de precisão

Teste	Analista	Nível	Critério de aceitação	<i>p</i> -Valor
Shapiro-Wilk	1	1	> 0,05 (95% de confiança)	0,2431
		2		0,6913
		3		0,3031
	2	1		0,7582
		2		0,7146
		3		0,6560
Grubbs	1	1	> 0,05 (95% de confiança)	0,6034
		2		0,1437
		3		0,6463
	2	1		0,1975
		2		0,3526
		3		0,1650

Fonte: Autoria própria (2025).

Ambos os conjuntos de dados gerados pelos analistas apresentaram distribuição normal e ausência de valores anômalos. A partir dos dados obtidos das replicatas e das curvas de calibração, calculou-se a recuperação para os Analistas 1 e 2. Os resultados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados de recuperação do teste de exatidão

Analista	Inclinação da reta	Intercepto	Nível	Critério de aceitação	Recuperação (%)
1	$2,227 \times 10^{-5}$	$- 3,293 \times 10^{-3}$	1	Entre 90% e 107%	89,67
			2		78,59
			3		80,14
2	$1,593 \times 10^{-5}$	$+ 1,558 \times 10^{-3}$	1	Entre 90% e 107%	98,01
			2		95,94
			3		91,71

Fonte: Autoria própria (2025).

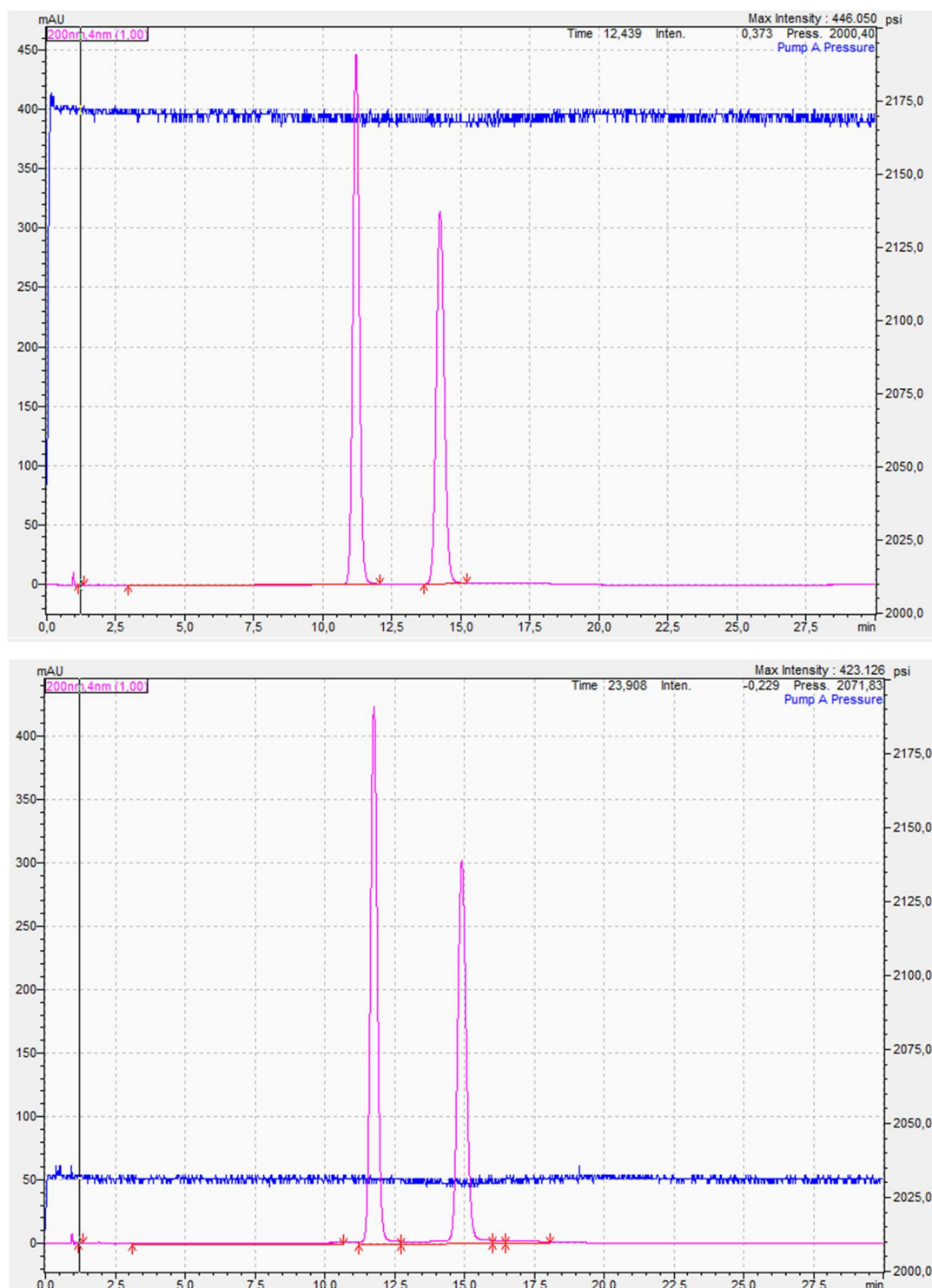
Assim como os resultados de DPR se mostraram parcialmente insuficientes para a aprovação no teste de precisão, os resultados de recuperação também se mostraram parcialmente insuficientes para a aprovação no teste de exatidão, visto que os valores obtidos se situam fora do critério de aceitação.

Devido à reprovação dos testes realizados, investigou-se os cromatogramas das corridas (Figura 26) e constatou-se que a pressão na coluna cromatográfica variou entre injeções, indicando que o equipamento não se encontrava adequado para realizar as análises. Essa diferença de pressão entre corridas pode ocasionar diferentes tempos de retenção, o que pode ser observado na Figura 27. Caso o pico de interesse desloque para um tempo de retenção onde se encontra outro pico, ocorre uma sobreposição que interfere diretamente na área obtida. Essa sobreposição não está presente nos picos de DMF dos testes preliminares, porém está presente nos picos de DMF da validação e pode ser visualizada na Figura 28. Enquanto as purezas de pico obtidas nos testes preliminares foram de 99,99% e 97,78% (Figuras 17 e 18 respectivamente, página 36), a pureza obtida durante a validação foi de 87,24% (Figura 28).

Uma possível causa é uma leve sujeira observada no módulo de injeção do HPLC, que pode ser proveniente da precipitação de sais utilizados para tamponar a FM, como o ácido fosfórico. Outra possível causa é a eficiência da coluna estar reduzindo, o que pode gerar uma

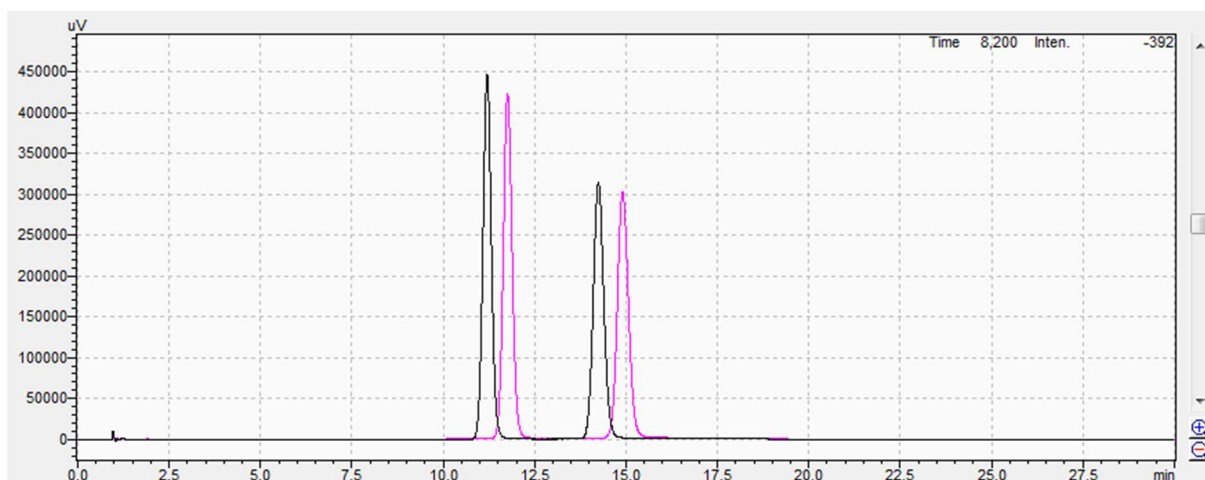
“quebra” do pico de DMF em dois picos, dificultando o processo de aquisição dos dados. Uma investigação mais detalhada deve ser realizada para futuros testes.

Figura 26 – Cromatogramas das injeções do teste de linearidade



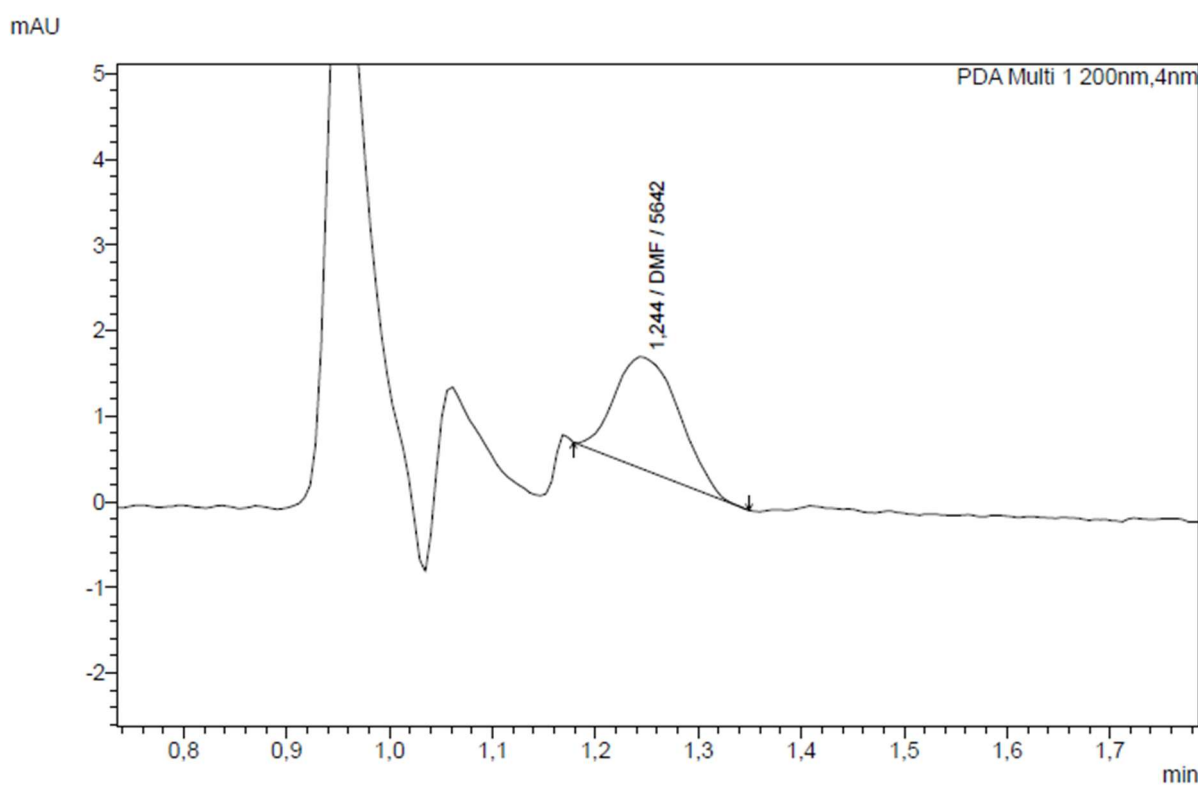
Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2025).

Figura 27 – Cromatogramas do teste de linearidade sobrepostos



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2025).

Figura 28 – Cromatograma do teste de linearidade com sobreposição de picos



Fonte: Autoria própria, gerado através do *software* LabSolutions (2025).

4.5. Limites de detecção e quantificação

Como demonstrado, os resultados obtidos teste de linearidade não foram exitosos. Logo, não foi possível realizar os cálculos do LD e do LQ.

4.6. Robustez

A partir dos cromatogramas obtidos, calculou-se a área correspondente ao pico de DMF. Os resultados estão descritos na Tabela 20. Para prosseguir para a avaliação estatística dos dados, normalizou-se a área obtida dividindo pelo volume de injeção, visto que esta é diretamente ligada à área do pico. O resultado estatístico do teste ANOVA (*multi-way*) estão descritos na Tabela 21.

Tabela 20 – Resultados obtidos no teste de robustez

Análise	Replicata	Área	Área normalizada
1	1	3089	123,56
	2	2585	103,40
2	1	1553	77,65
	2	1624	81,20
3	1	8416	420,80
	2	8192	409,60
4	1	6077	243,08
	2	5923	236,92
5	1	8819	352,76
	2	10003	400,12
6	1	2963	148,15
	2	3232	161,60
7	1	3619	180,95
	2	3343	167,15
8	1	3322	132,88
	2	3259	130,36

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 21 – Resultado do ANOVA (*multi-way*) para o teste de robustez

Variável	Critério de aceitação	<i>p</i> -Valor
Temperatura da coluna	> 0,05 (95% de confiança)	0,7046
Fluxo da FM		3,169 x10 ⁻⁵
Integração do pico		1,654 x10 ⁻⁷
Comprimento de onda		8,746 x10 ⁻⁹
Grau do ácido fosfórico		0,08911
Volume de injeção		0,2163
Período de estabilidade da amostra		3,344 x10 ⁻⁶

Fonte: Autoria própria (2025).

Como foi possível observar, os resultados esperados foram obtidos. Quatro das sete variáveis influenciam diretamente na resposta analítica obtida.

A temperatura da coluna afeta a viscosidade da FM, o que pode influenciar na interação entre analito e FE. Porém, para a faixa estudada, que compreende valores próximos de temperatura ambiente, essa influência não é observada.

O fluxo da FM interfere diretamente no resultado obtido, pois em fluxos menores, pode-se ocorrer também um alargamento do pico, que influencia na simetria do pico (fator de cauda), na pureza de pico e no NPT, fornecendo resultados mais imprecisos. Logo, espera-se que a variável seja importante.

Para áreas tão pequenas com as obtidas para o DMF, o *software* do HPLC (LabSolutions) dificilmente consegue integrar o pico corretamente, logo todos os cromatogramas da validação foram integrados manualmente. O *p*-valor obtido evidencia a necessidade dessa integração manual.

Cada analito possui um λ ideal onde absorve melhor a luz incidente. Isso se dá ao fato de diferentes grupos funcionais e ligações duplas estarem presentes nas moléculas, estes sendo responsáveis pela absorção no UV. Essa absorção é diretamente proporcional à área do pico, logo, diferentes λ geram diferentes áreas, como indicado pelo *p*-valor.

O grau do ácido fosfórico diz respeito à quantidade de impurezas presentes, estas podendo interferir ou não na corrida cromatográfica. Como demonstrado, mesmo que o *p*-valor esteja próximo do critério de aceitação, o grau não interfere na análise.

Como dito anteriormente, o volume de injeção é diretamente proporcional às áreas dos picos, logo se espera que as áreas normalizadas sejam estatisticamente iguais. Para volumes

muito grandes de injeção, corre-se o risco de sobrecarregar os sítios de interação da FE, ocasionando em um alargamento do pico cromatográfico. Porém, para a faixa estudada, isso não ocorreu. Em condições ideais do HPLC, o *p*-valor seria maior, pois as áreas sofreriam menos variações, que são propagadas na normalização.

Idealmente, o preparo das amostras para análise deve ser realizado no mesmo dia da análise, para evitar que os componentes sofram degradação ou mudanças de concentração, o que interfere na obtenção de resultados consistentes. O *p*-valor abaixo do critério de aceitação indica que esse preparo no dia da análise é crucial para o DMF, sendo esta uma molécula relativamente estável. A sua degradação pode ter ocorrido em detrimento da presença do ácido fosfórico, cujos prótons liberados podem ter induzido a reação de hidrólise do DMF.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou desenvolver um método analítico para detectar e quantificar de forma confiável e reprodutível o solvente DMF através do HPLC com detector DAD no IFA talidomida. Desejou-se utilizar a corrida já realizada no doseamento do IFA para quantificar o DMF, logo são refletidas as condições cromatográficas. As figuras de mérito avaliadas são as figuras preconizadas pela ANVISA através da RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Os parâmetros verificados no método foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LD, LQ e robustez.

As curvas de calibração foram construídas para que o teor limite de DMF na solução final do doseamento ($0,0880 \mu\text{g mL}^{-1}$) se situasse próximo do nível intermediário. Os testes preliminares se deram de maneira exitosa, com r^2 acima de 0,980. Através deles, foram ajustados parâmetros no cromatógrafo que muitas vezes não são observados pelos operadores. Na análise da seletividade, foi comprovado através do teste ANOVA que a presença dos compostos utilizados na análise do teor do IFA não impacta na área do pico cromatográfico de DMF. Na análise da linearidade, a curva com matriz foi aprovada em todos os testes estatísticos, porém os valores de r e r^2 se mostraram abaixo do critério de aceitação. Já a curva sem matriz foi reprovada no teste de Shapiro-Wilk, ou seja, os seus dados não seguem a distribuição normal, o que impede que seja utilizada na validação do método. Na análise de precisão, dois dos seis níveis realizados pelos analistas apresentaram DPR superior ao critério estabelecido pela AOAC, enquanto na análise de exatidão, apenas as recuperações dos níveis do Analista 2 se situaram dentro da faixa estabelecida. Devido aos resultados encontrados no teste de linearidade terem reprovados, o LD e o LQ não foram calculados. Na análise de robustez, as variáveis que se mostraram importantes para o método foram o fluxo da FM, a integração do pico, que deve ser feita manualmente, o λ e a estabilidade da amostra, que deve ser preparada no dia da análise.

Foram constatados problemas com o cromatógrafo utilizado nas análises, o que impossibilita que os resultados obtidos sejam avaliados com confiança. Destaca-se aqui que as áreas obtidas são relativamente pequenas, o que aumenta a variação percentual das respostas. As etapas da presente validação devem ser repetidas, prezando o funcionamento correto do HPLC. Caso os resultados obtidos ainda sejam insatisfatórios, deve-se utilizar concentrações maiores de DMF, abandonando a ideia de utilizar a mesma corrida do doseamento, visto que os resultados obtidos no trabalho já refletem uma certa probabilidade de sucesso na validação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PORTADORES DA SÍNDROME DA TALIDOMIDA (ABPST). **O que é Talidomida**. 2021. Disponível em: <http://www.talidomida.org.br/o-que-e-talidomida/>. Acesso em: 17 julho 2024.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. Rockville, 2012.

BARBOSA, J. V. L. **Um pouco sobre a Talidomida**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, PET Química UFC, 2018. Disponível em: <http://www.petquimica.ufc.br/um-pouco-sobre-a-talidomida/>. Acesso em: 17 julho 2024.

BELMONTE, I. dos S. **Desenvolvimento de metodologia analítica dedicada, por HPLC-UV, para determinação de paraquate em amostras de água para consumo humano**. 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2023.

BORGES, L. d. G.; FRÖEHLICH, P. E. Talidomida: novas perspectivas para a utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, 2003. p. 96-102. DOI: 10.1590/S0104-42302003000100041.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017. 21 p.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rev. 9. Rio de Janeiro: INMETRO, 2020. 30 p.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. **Econometrica**, v. 47, n. 5, set. 1979. p. 1287-1294. DOI: 10.2307/1911963.

BROWN, S.; TAULER, R.; WALCZAK, B. Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis. **Elsevier**, v. 1-4, 2ª ed., 2020. 2944 p.

CÉSAR, I. da C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, 2009. DOI: 10.1590/S1984-82502009000200007.

DOMINGUES, K. M. *et al.* Estimação de intervalos de confiança via reamostragem bootstrap. In: ENCONTRO INTERESTADUAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 1., 2015, São João da Barra. **Anais de Conferência**, São João da Barra: SESC Mineiro de Grussaí, 2015. 12 p.

FRINK, L. A.; WEATHERLY, C. A.; ARMSTRONG, D. W. Water determination in active pharmaceutical ingredients using ionic liquid headspace gas chromatography and two different detection protocols. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, 2014. p. 111-117. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.034.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. DIRETORIA INDUSTRIAL. DIVISÃO DE CONTROLE DE QUALIDADE. **Análise da matéria-prima Talidomida – DI-DCQ-048-MET-0068**. Belo Horizonte: rev. 10, 2022. 30 p.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Talidomida**. 2020. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/talidomida/>. Acesso em: 17 julho 2024.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, fev. 1969. p. 1-21. DOI: 10.1080/00401706.1969.10490657.

HILL, E. G. Regression diagnostics. **Biometry** **755**, 2009. 48 p.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 2, 1995. p. 331-343. DOI: 10.1351/pac199567020331

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Harmonised Guideline: Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6)**. [S.I.]: ICH, 2019. 38 p.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, out. 2001. p. 683-688. DOI: 10.1590/S0100-40422001000500016.

LOMBA, M. R. S. da *et al.* O uso de matrizes biológicas e testes analíticos presentes na toxicologia forense. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 12, n. 4, 2023. p. 88-102. DOI: 10.15260/rbc.v12i4.717.

LOUVIS, A. da R.; SILVA, N. A. do A. N,N-Dimetilformamida (CAS No. 68-12-2). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016. 22 p.

MENEZES FILHO, A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; MILLER, R. D. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. **Pearson Education**. v. 1, 7ª ed., 2018. 312 p.

MOREIRA, E. D. T. **Desenvolvimento e validação de metodologias SPE/HPLC para a determinação de estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais**. 2015. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

N,N-DIMETILFORMAMIDA. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. **Sigma-Aldrich**, v. 6.19, 2024. 13 p.

NASCIMENTO, R. F. do *et al.* Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. **Imprensa Universitária**, 2018. 334 p.

OLIVEIRA, A. G. d., SILVEIRA, D. Insumos farmacêuticos ativos (IFA) – Das necessidades à perversa realidade brasileira. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v. 33, n. 1, 2021. p. 3-5. DOI: 10.14450/2318-9312.v33.e1.a2021.pp3-5.

PEDROSA, F. de C. **Cromatografia Gasosa aplicada em Estudos de Metabolômica**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

PEREIRA, G. M. A. **Ionização ambiente em espectrometria de massas**: construção de uma fonte de ionização LTP e modificações na técnica PS-MS. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, dez. 1965. p. 591-611. DOI: 10.2307/2333709.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. Statistical Methods. **Iowa State University Press**, 8ª ed., 1989. 503 p.

SKOOG, D. *et al.* Fundamentos de química analítica. **Editora Cengage**, v. 1, 8ª ed., 2006. 1124 p.

ZHAI, H. L. *et al.* An application of wavelet moments to the similarity analysis of three-dimensional fingerprint spectra obtained by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. **Food Chemistry**, v. 145, fev. 2014. p. 625-631. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.112.

APÊNDICE A – Script R para Análises Estatísticas

```
#-----#
cam <- readline(prompt="Insira o caminho do arquivo (copiar caminho): ")
#-----#

# Leitura da planilha Excel e visualização dos dados.
# Instalação dos pacotes necessários para todo o script.
if (TRUE) {
  pacotes <-
c("readxl","openxlsx","dplyr","outliers","ggplot2","car","tidyr","lmtest","EnvStats","tibble")
  verif <- function(x) {
    if (!require(x,character.only=TRUE)) {
      suppressMessages(install.packages(x,dependencies=TRUE))}
    suppressMessages(library(x,character.only=TRUE))}
  suppressMessages(lapply(pacotes,verif))

  cam <- gsub("\\\\","/",cam)
  cam <- gsub("'",",",cam)
  dados <- read_xlsx(cam)
  if (exists("dados_og")) {remove(dados_og)}
  print(dados)
}
#-----#

# Leitura do arquivo CSV.
# Instalação dos pacotes necessários para todo o script.
# Caso apresente erro, abra o arquivo no Excel e salve como CSV.

separador <- (";") # Ajustar de acordo com o arquivo gerado.

if (TRUE) {
  pacotes <-
c("readxl","openxlsx","dplyr","outliers","ggplot2","car","tidyr","lmtest","EnvStats")
  verif <- function(x) {
```

```

if (!require(x,character.only=TRUE)) {
  suppressMessages(install.packages(x,dependencies=TRUE))}
suppressMessages(library(x,character.only=TRUE))}
suppressMessages(lapply(pacotes,verif))

cam <- gsub("\\\\", "/", cam)
cam <- gsub("'", "", cam)
brutos <- read.csv(cam, sep=separador)
if (exists("dados_og")) {remove(dados_og)}
cat("\nDimensão do arquivo CSV:", dim(brutos)[1], "linhas por", dim(brutos)[2], "colunas.")
# A dimensão do arquivo deve possuir um número de colunas acima de 5.
}

# Tratamento e visualização dos dados CSV para injeções sequenciais.

names(brutos) # Checar qual coluna contém o dado desejado.
resp <- brutos$X.2 # Ajustar para dado desejado
nomes <- c("Branco", "DMF", "Talidomida", "Fenacetina", "Matriz") # Ajustar para nomes das
amostras
repl <- 3 # Ajustar para número de replicatas

if (TRUE) {
  Valor <- c()
  for (x in resp) {
    if (grepl("^-?\\d+(,\\d+)?$", x)) {
      x <- gsub(",", ".", x)
      Valor <- c(Valor, as.numeric(x))}
  }

  Replicata <- rep(1:repl, times=length(nomes))
  Grupo <- rep(nomes, each =repl)
  ext <- names(sort(table(resp), decreasing=TRUE))[2]

  dados <- tibble::tibble(Valor, Replicata, Grupo)

```

```
names(dados)[1] <- ext
print(dados)
}
```

Caso deseje extrair pelo Sample Name:

```
names(brutos) # Checar qual coluna contém o dado desejado.
resp <- brutos$X.2 # Ajustar para dado desejado
```

```
if (TRUE) {
  Valor <- c()
  for (x in resp) {
    if (grepl("^-?\\d+(,\\d+)?$", x)) {
      x <- gsub(",", ".", x)
      Valor <- c(Valor, as.numeric(x))}
  }
```

```
Grupo <- c()
for (i in seq_along(brutos$X.Header)) {
  if (brutos$X.Header[i]=="Sample Name") {
    Grupo <- c(Grupo,brutos$X[i])
  }
}
```

```
ext <- names(sort(table(resp), decreasing=TRUE))[2]
```

```
dados <- tibble::tibble(Valor,Grupo)
names(dados)[1] <- ext
dados <- dados %>% arrange(Grupo)
print(dados)
}
```

```
#-----#
```

Intervalo de Confiança

Retorna a média, desvio padrão, DPR (%) e a incerteza.

```

if (TRUE) {
  cd <- 2 # Casas decimais
  alpha <- 99 # Nível de significância

  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo (caso queira calcular a coluna toda, colocar 0)

  dados_sv <- dados
  if (G2==0) {
    G <- rep(c(names(dados)[G1]),each=nrow(dados))
    dados <- data.frame(dados,G)
    G2 <- ncol(dados)}

  metr <- function(df) {
    med <- mean(df[[G1]],na.rm=TRUE)
    dp <- sd(df[[G1]],na.rm=TRUE)
    num <- sum(!is.na(df[[1]]))

    dpr <- (dp/med)*100
    t_val <- -qt((100-alpha)/200,df=(num-1))
    ic <- ((t_val*dp)/sqrt(num))

    med_f <- formatC(med,format="f",decimal.mark=",",big.mark=".",digits=cd)
    dp_f <- formatC(dp,format="f",decimal.mark=",",big.mark=".",digits=cd)
    dpr_f <- formatC(dpr,format="f",decimal.mark=",",big.mark=".",digits=2)
    ic_f <- formatC(ic,format="f",decimal.mark=",",big.mark=".",digits=cd)

    result <- data.frame(
      Grupo=unique(df[[G2]],
      Média=med_f,
      Desvio_Padrão=dp_f,
      DPR=dpr_f,
      Resultado=paste(med_f,"±",ic_f))

```



```

return(result)}

valor <- dados %>%
  group_by(dados[[G2]]) %>%
  group_split() %>%
  purrr::map_dfr(metr)

cat("Resultados por grupo:\n\n")
cat(sprintf("%-12s %-10s %-10s %-10s %-20s\n","Grupo","Média","Desvio
Padrão","DPR (%)","Resultado"))
for (i in 1:nrow(valor)) {
  cat(sprintf("%-12s %-10s %-10s %-10s %-
20s\n",valor$Grupo[i],valor$Média[i],valor$Desvio_Padrão[i],
          valor$DPR[i],valor$Resultado[i]))
  if (i < nrow(valor)) {cat("-----\n")}}
dados <- dados_sv
}
#-----#
# Gráfico da Reta e Regressão Linear (R e R²)
# Fornece o gráfico da regressão e calcula a significância da regressão.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]], data=dados)
  R2 <- summary(mod)$r.squared
  suppressMessages(print(
    ggplot(dados,aes(x=get(names(dados)[G1]),y=get(names(dados)[G2]))) +
    geom_point(color="black",size=3) +
    geom_smooth(method="lm",se=FALSE,color="red",linewidth=0.8) +
    labs(title=paste("Ajuste linear"),x=names(dados)[G1],y=names(dados)[G2]) +
    theme_test()))

```

```

print(summary(mod))

if (summary(mod)$coefficients[2,4] > 0.05) {cat("p-Valor > 0,05: O coeficiente angular é
significativamente igual a 0.")}
else {cat("p-Valor < 0,05: O coeficiente angular é significativamente diferente de 0.")}

cat("\n\nCoeficiente de correlação (R) :",format(sqrt(R2),digits=4))
cat("\n\nCoeficiente de determinação (R²):",format(R2,digits=4))
}
#-----#
# Limites de detecção e quantificação (regressão linear)
# Fornece os limites estimados pelas curvas de calibração.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração
  G3 <- 4 # Ajustar para coluna da Curva

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]],data=dados)
  IC <- as.numeric(mod$coefficients[2])

  calc <- function(df) {
    mod_i <- lm(df[[G1]]~df[[G2]],data=df)
    return(summary(mod_i)$coefficients[1,1])}

  intcp <- dados %>%
    group_by(dados[[G3]]) %>%
    do(val = calc())
  DPA <- sd(as.numeric(intcp$val))

  LD <- DPA*3.3/IC
  LQ <- DPA*10/IC

  cat("\nInclinação da reta:",round(IC,1))

```

```

cat("\nDesvio padrão:",round(DPA,1))
cat("\n\nO limite de detecção estimado é de",format(LD,digits=3),"(k: 3,3)")
cat("\nO limite de quantificação estimado é de",format(LQ,digits=3),"(k: 10)")
}
#-----#

# Gráfico dos Dados
  # Fornece o gráfico dos dados.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração (caso queira usar o índice, colocar 0)

  dados_sv <- dados
  if (G2==0) {
    G <- seq_len(nrow(dados))
    dados$Índice <- G
    G2 <- ncol(dados)}

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]], data=dados)
  suppressMessages(print(
    ggplot(dados,aes(x=get(names(dados)[G2]),y=get(names(dados)[G1]))) +
    geom_point(color="black",size=3) +
    labs(title=paste("Dados"),x=names(dados)[G2],y=names(dados)[G1]) +
    theme_test()))
  dados <- dados_sv
}
#-----#

# Gráfico dos Resíduos
  # Fornece o gráfico dos resíduos da regressão linear.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]], data=dados)

```

```

res <- resid(mod)

print(ggplot(dados, aes(x=get(names(dados)[G2]), y=res)) +
      geom_point(color="black", size=3) +
      geom_hline(yintercept=0, linetype="longdash", color="darkgrey", linewidth=0.8) +
      labs(title=paste("Dispersão de Resíduos"), x=names(dados)[G2], y="Resíduos") +
      theme_test())
}
#-----#

# Equação da Reta
# Fornece a equação da reta (Y= Coluna 1; X= Coluna 2).
if (TRUE) {
  cd <- 2 # Casas decimais

  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]], data=dados)
  cat("Y:",names(dados)[G1],"nX:",names(dados)[G2])

  if (mod$coefficients[1] >=0) {cat("\n\nEquação: y = ",round(mod$coefficients[2],cd),"*x +
",
      round(mod$coefficients[1],cd),sep="")}
  else {cat("\n\nEquação: y = ",round(mod$coefficients[2],cd),"*x - ",
      round(abs(mod$coefficients[1]),cd),sep="")}
}
#-----#

# Coeficientes de Determinação
# Fornece o R² de múltiplas curvas de calibração.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração
  G3 <- 4 # Ajustar para coluna da Curva

```

```

calc <- function(df) {
  tryCatch({
    mod <- lm(df[[G2]]~df[[G1]],data=df)
    r2 <- summary(mod)$r.squared
    return(data.frame(
      Curva=unique(df[[G3]]),
      R2=format(r2, digits = 4))),
    error=function(e) {
      return(data.frame(
        Curva=unique(df[[G3]]),
        R2=NA))})}

ress <- dados %>%
  group_by(dados[[G3]]) %>%
  group_split(.keep=TRUE) %>%
  purrr::map_dfr(calc) %>%
  arrange(match(Curva,unique(dados[[G3]])))

cat("R² por curva:\n\n")
cat(sprintf("%-12s  %-10s\n","Curva","R²"))
for (i in 1:nrow(ress)) {
  cat(sprintf("%-12s  %-10s\n",ress$Curva[i],ress$R2[i]))
  if (i < nrow(ress)) {
    cat("-----\n")}}
}

#-----#

# ANOVA (F-Snedecor)

# Avalia se a regressão linear da curva de calibração é significativa.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

```

```

mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]],data=dados)
anv <- anova(mod)
pVal <- anv$'Pr(>F)'[1]

cat("\nANOVA: Regressão Linear\n\nnp-Valor calculado:",format(pVal,digits=4),"\n")

if (pVal >0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: A regressão da curva não é significativa.")}
else {cat("\np-Valor < 0,05: A regressão da curva é significativa.")}
}
#-----#
# ANOVA (lack of fit)
# Avalia se a falta de ajuste da curva de calibração é significativa.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 3 # Ajustar para coluna do Nível

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]],data=dados)
  LOF <- anovaPE(mod)
  pVal <- LOF$'Pr(>F)'[2]

  cat("\nANOVA: Lack of fit\n\nnp-Valor calculado:",format(pVal,digits=4),"\n")

  if (pVal >0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: Não há desvio de linearidade.")}
  else {cat("\np-Valor < 0,05: Há desvio na linearidade.")}
}
#-----#
# ANOVA (One-way)
# Avalia se as médias entre dois fatores são iguais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

  anv <- aov(dados[[G1]]~dados[[G2]],data=dados)

```

```

pVal <- summary(anv)[[1]][["Pr(>F)"]][1]
cat("\nANOVA: Comparação de Médias\nnp-Valor calculado:",format(pVal,digits=4),"\n")

if (pVal >0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: As médias dos grupos são equivalentes.")}
else {cat("\np-Valor < 0,05: As médias dos grupos não são equivalentes.")}
}
#-----#

# ANOVA (Multi-way)
# Avalia se as médias entre diferentes fatores são iguais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta (ordenadas)
  G2 <- 5 # Ajustar para coluna dos Nomes dos fatores (ordenados)
  n <- 2 # Ajustar para número de replicatas

  dados_sv <- dados
  a <- rep(c(1,1,1,1,-1,-1,-1,-1),each=n)
  b <- rep(c(1,1,-1,-1,1,1,-1,-1),each=n)
  c <- rep(c(1,-1,1,-1,1,-1,1,-1),each=n)
  d<- a*b
  e <- a*c
  f <- b*c
  g <- a*b*c

  dados <- data.frame(dados[[G1]],a,b,c,d,e,f,g)
  anvR <- aov(dados[[G1]]~a*b*c*d*e*f*g,data=dados)

  for (i in 1:7) {
    nome <- as.character(dados_sv[i,G2])
    pVal <- summary(anvR)[[1]]$'Pr(>F)'[i]
    cat("\n\nPara '",nome,"': p-Valor = ',format(pVal,digits=4),sep='')
    if (pVal >0.05) {cat("\nnp-Valor > 0,05: O fator não influencia na resposta.")
      cat("\n\n#-----#")}
    else {cat("\nnp-Valor < 0,05: O fator influencia na resposta.")

```

```

        cat("\n\n#-----#"))}}
dados <- dados_sv
}
#-----#
# Teste de Breusch-Pagan
    # Avalia a homocedasticidade dos resíduos de uma curva de calibração normal.
if(TRUE) {
    G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
    G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

    mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]],data=dados)
    BP <- ncvTest(mod)
    print(BP)

    if (BP$p > 0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: Os resíduos são homocedásticos.")}
    else {cat("\np-Valor < 0,05: Os resíduos não são homocedásticos.")}
}
#-----#
# Teste de Durbin-Watson
    # Avalia a autocorrelação dos resíduos de uma curva de calibração.
if(TRUE) {
    G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
    G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

    mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]], data=dados)
    DW <- dwtest(mod,alt="two.sided")
    print(DW)

    if (DW$p.value >= 0.05) {cat("p-Valor > 0,05: Os resíduos não apresentam
autocorrelação.")}
    else {cat("p-Valor < 0,05: Os resíduos apresentam autocorrelação.")}
}
#-----#

```



```

# Teste de Fisher
  # Avalia se as variâncias entre dois grupos são iguais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

  F1 <- "Branco" # Ajustar para o nome do Grupo 1
  F2 <- "Matriz" # Ajustar para o nome do Grupo 2

  dados_F1 <- dados[dados[[G2]]==F1,]
  dados_F2 <- dados[dados[[G2]]==F2,]

  v1 <- var(dados_F1[[G1]])
  v2 <- var(dados_F2[[G1]])
  Fval <- max(v1,v2) / min(v1,v2)
  GL1 <- length(dados_F1[[G1]]) -1
  GL2 <- length(dados_F2[[G1]]) -1
  crit <- pf(Fval,GL1,GL2,lower.tail=FALSE)
  cat('Teste de Fisher entre "',F1,'" e "',F2,'"':',sep=")
  cat("\np-Valor calculado:",format(crit,digits=4),"\n")

  if (crit >=0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: As variâncias são equivalentes.")}
  else {cat("\np-Valor < 0,05: As variâncias não são equivalentes.")}
}
#-----#

# Teste de Grubbs (dados brutos)
  # Avalia se existe um outlier em um conjunto de dados normais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

  grubb <- function(df) {
    tryCatch({test <- grubbs.test(df[[G1]])

```

```

if (test$p.value <0.05) {
  val_outl <- ifelse(abs(df[[G1]]-mean(df[[G1]]))==max(abs(df[[G1]]-mean(df[[G1]]))),
                    df[[G1]],NA)
  ind_outl <- which(df[[G1]]==val_outl)}
else {ind_outl <- NULL}

result <- data.frame(
  Grupo=unique(df[[G2]]),
  p_Valor=format(test$p.value, digits = 4),
  Outlier=ifelse(test$p.value <0.05,"Sim","Não"))

if (!is.null(ind_outl)) {result$Índice <- paste(ind_outl)}
else {result$Índice <- "-"}
return(result)},
error=function(e) {
  data.frame(
    Grupo=unique(df[[G2]]),
    p_Valor=NA,
    Outlier="Erro",
    Índice="-"))}

Grub <- dados %>%
  mutate(Ordem=row_number()) %>%
  group_by(dados[[G2]]) %>%
  group_split(.keep=TRUE) %>%
  purrr::map_dfr(grubb) %>%
  arrange(match(Grupo,unique(dados[[G2]])))

cat("Teste de Grubbs para identificação de outliers.\n\n")
cat(sprintf("%-12s %-10s %-10s %-20s\n","Grupo","p Valor","Outlier","Índice"))
for (i in 1:nrow(Grub)) {

```

```

    cat(sprintf("%-12s %-10s %-10s %-
20s\n",Grub$Grupo[i],Grub$p_Valor[i],Grub$Outlier[i],Grub$Índice[i]))
    if (i < nrow(Grub)) {
        cat("-----\n")}}
}
#-----#
# Teste de Grubbs (regressão linear)
    # Avalia se existe um outlier nos resíduos de uma curva de calibração normal.
if (TRUE) {
    G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
    G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

    if (!exists("dados_og")) {dados_og <- dados}

    mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]],data=dados)
    res <- resid(mod)
    Grub <- grubbs.test(res)
    print(data.frame("Resíduos"=round(res,4)))
    print(Grub)

    if (Grub$p.value >0.05) {
        cat("p-Valor > 0,05: Não foram detectados outliers nos resíduos.")
        cat("\n\nPorcentagem de outliers: ",round(100*(nrow(dados_og)-
nrow(dados))/nrow(dados_og),2),"%",sep=""))}
    else {
        cat("p-Valor < 0,05: Um outlier foi detectado nos resíduos. (Índice
",which.max(abs(res)),")",sep="")
        cat("\n\nPorcentagem de outliers: ",round(100*(1+nrow(dados_og)-
nrow(dados))/nrow(dados_og),2),"%",sep=""))}
    }
#-----#
# Resíduos Padronizados de Jackknife
    # Avalia se existem múltiplos outliers em uma curva de calibração.

```

```

if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  if (!exists("dados_og")) {dados_og <- dados}

  mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]],data=dados)
  res_padr <- rstudent(mod)
  outl <- which(abs(res_padr) > 2.5)

  print(data.frame("Resíduos"=round(res_padr,3),"Resultado"=ifelse(abs(res_padr)>2.5,"Outlier!","")))
  count <- length(outl)+nrow(dados_og)-nrow(dados)

  cat("\nResíduos Padronizados de Jackknife (> 2,5):\n")
  if (length(outl)==0) {
    cat("\nNão foram identificados outliers.\n")
  }
  else if (length(outl)==1) {
    cat("\nÍndice identificado como outlier: ",outl,"\n",sep="")
    suppressMessages(print(
      ggplot(dados,aes(x=get(names(dados)[G1]),y=get(names(dados)[G2]))) +
      geom_point(color="black",size=3) +
      geom_smooth(method="lm",se=FALSE,color="gray",linewidth=0.8) +
      geom_point(data=dados[outl,
],aes(x=get(names(dados)[G1]),y=get(names(dados)[G2])),color="red",pch=19,size=4) +
      labs(title=paste("Teste de Resíduos Padronizados de
Jackknife"),x=names(dados)[G1],y=names(dados)[G2]) +
      theme_test()))}
  else {
    cat("\nÍndices identificados como outliers: ",paste(outl,collapse=" ", "\n",sep=""))
    suppressMessages(print(
      ggplot(dados,aes(x=get(names(dados)[G1]),y=get(names(dados)[G2]))) +

```

```

geom_point(color="black",size=3) +
geom_smooth(method="lm",se=FALSE,color="gray",linewidth=0.8) +
geom_point(data=dados[outl,
],aes(x=get(names(dados)[G1]),y=get(names(dados)[G2])),color="red",pch=19,size=4) +
  labs(title=paste("Teste de Resíduos Padronizados de
Jackknife"),x=names(dados)[G1],y=names(dados)[G2]) +
  theme_test()))}

cat("\nPorcentagem de outliers: ",round(100*(count)/nrow(dados_og),2),"% (",count," de
",nrow(dados_og),")",sep="")
}
#-----#

# Teste de Shapiro-Wilk (dados brutos)
# Avalia se um conjunto de dados segue a distribuição normal.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

  shap <- function(df) {tryCatch({test <- shapiro.test(df[[G1]])

  result <- data.frame(
    Grupo=unique(df[[G2]]),
    p_Valor=format(test$p.value, digits = 4),
    Normalidade=ifelse(test$p.value < 0.05, "Não", "Sim"))
  return(result)},
  error=function(e) {
    data.frame(
      Grupo=unique(df[[G2]]),
      p_Valor=NA,
      Normalidade="Erro")})}

SW <- dados %>%
  mutate(Ordem=row_number()) %>%

```

```

group_by(dados[[G2]]) %>%
group_split(.keep=TRUE) %>%
purrr::map_dfr(shap) %>%
arrange(match(Grupo,unique(dados[[G2]])))

cat("Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade.\n\n")
cat(sprintf("%-12s %-10s %-20s\n","Grupo","p Valor","Normalidade"))
for (i in 1:nrow(SW)) {
  cat(sprintf("%-12s %-10s %-20s\n",SW$Grupo[i],SW$p_Valor[i],SW$Normalidade[i]))
  if (i < nrow(SW)) {
    cat("-----\n")
  }
}
#-----#
# Teste de Shapiro-Wilk (regressão linear)
# Avalia se uma curva de calibração segue a distribuição normal.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]],data=dados)
  res <- resid(mod)
  Norm <- shapiro.test(res)
  print(data.frame("Resíduos"=round(res,4)))
  print(Norm)

  if (Norm$p.value >0.05) {cat("p-Valor > 0,05: Os resíduos seguem a distribuição normal.")}
  else {cat("p-Valor < 0,05: Os resíduos não seguem a distribuição normal.")}
}
#-----#
# Teste de t-Student
# Avalia se as médias entre dois grupos independentes são iguais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta

```

```

G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

T1 <- "Branco" # Ajustar para o nome do Grupo 1
T2 <- "Matriz" # Ajustar para o nome do Grupo 2

dados_t1 <- dados[dados[[G2]]==T1,]
dados_t2 <- dados[dados[[G2]]==T2,]

tVal <- t.test(dados_t1[[G1]],dados_t2[[G1]])
print(tVal)
cat('Teste t entre "',T1,'" e "',T2,'"':',sep=")
cat("\np-Valor calculado:",format(tVal$p.value,digits=4),"\n")

if (tVal$p.value >=0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: As médias são equivalentes.")}
else {cat("\np-Valor < 0,05: As médias não são equivalentes.")}
}
#-----#
# Teste de t-Student pareado
# Avalia se as médias entre duas respostas de um mesmo grupo são iguais.
if (TRUE) {
  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 4 # Ajustar para coluna do Grupo

  T1 <- "Branco" # Ajustar para o nome do Grupo 1
  T2 <- "Matriz" # Ajustar para o nome do Grupo 2

  dados_t1 <- dados[dados[[G2]]==T1,]
  dados_t2 <- dados[dados[[G2]]==T2,]

  tVal <- t.test(dados_t1[[G1]],dados_t2[[G1]],paired=TRUE)
  print(tVal)
  cat('Teste t pareado entre "',T1,'" e "',T2,'"':',sep=")
  cat("\np-Valor calculado:",format(tVal$p.value,digits=4),"\n")

```

```

if (tVal$p.value >=0.05) {cat("\np-Valor > 0,05: As médias são equivalentes.")}
else {cat("\np-Valor < 0,05: As médias não são equivalentes.")}
}
#-----#
# Calibração Externa
# Retorna a concentração de uma amostra frente a uma curva de calibração externa.
if (TRUE) {
  cd <- 4 # Casas decimais
  fd <- 1 # Fator de diluição
  qtde <- 3 # Número de leituras
  alpha <- 95 # Nível de significância

  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G2]]~dados[[G1]], data=dados)
  vet <- numeric(qtde)

  for (i in 1:qtde) {
    val <- readline(prompt=paste("Insira o valor da ",i,"ª leitura (",names(dados)[1],"):
",sep=""))
    val <- gsub(",",".",val)
    resp <- ((mod$coefficients[2]*as.numeric(val))+mod$coefficients[1])*fd
    vet[i] <- resp}

  x_sup <- -confint(mod,level=(alpha/100))[2,1] / confint(mod,level=(alpha/100))[1,2]
  x_inf <- -confint(mod,level=(alpha/100))[2,2] / confint(mod,level=(alpha/100))[1,1]
  mrg <- abs(((x_sup-x_inf)/2)*fd)

  df <- data.frame(Y=round(vet,digits=cd))
  names(df)[1] <- names(dados)[2]
  print(df)

```



```

cat("\nMédia: ",round(mean(vet),cd)," ± ",round(mrg,cd)," (" ,alpha,"% de
Confiança)",sep="")
}
#-----#
# Recuperação (%)
# Retorna a recuperação do analito de acordo com os valores da Calibração Externa.
if (TRUE) {
  vet2 <- numeric(length(vet))

  for (i in 1:qtde) {
    alvo <- readline(prompt=paste("Insira o valor alvo da ",i,"ª leitura: ",sep=""))
    alvo <- gsub(",",".",alvo)
    rec <- 100*vet[i]/as.numeric(alvo)
    vet2[i] <- rec}

  cat("\n")
  for (i in 1:length(vet2)) {cat("Recuperação do ",i,"º valor: ",round(vet2[i],2),"%\n",sep="")}
}
#-----#
# Adição de Padrão
# Retorna a concentração do analito na matriz.
if (TRUE) {
  cd <- 4 # Casas decimais
  fd <- 1 # Fator de diluição
  alpha <- 95 # Nível de significância

  G1 <- 1 # Ajustar para coluna da Resposta
  G2 <- 2 # Ajustar para coluna da Concentração

  mod <- lm(dados[[G1]]~dados[[G2]], data=dados)
  x <- (-coef(mod)[1] / coef(mod)[2])*fd
  x_sup <- -confint(mod,level=(alpha/100))[1,2] / confint(mod,level=(alpha/100))[2,1]

```

```

x_inf <- -confint(mod,level=(alpha/100))[1,1] / confint(mod,level=(alpha/100))[2,2]
mrg <- abs(((x_sup-x_inf)/2)*fd)

cat("Concentração do analito: ",format(-x,digits=cd)," ± ",format(mrg,digits=cd),"
(",alpha,"% de Confiança"),sep="")
}
#-----#

```