

Desenvolvimento de metodologia analítica para a validação do IFA paracetamol pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Lucas da Silva Carvalho – Aluno do Curso de Engenharia Química
Escola Politécnica - PUCRS

Resumo

O presente estudo desenvolveu e validou um método analítico para o IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) paracetamol, com base nas exigências da RDC nº 166/2017 da ANVISA. O processo incluiu desde o preparo das soluções até a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram avaliados parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. A seletividade foi demonstrada por meio de degradação forçada, comprovando que o método não sofre interferências de impurezas ou produtos de degradação. A linearidade foi validada com coeficiente de correlação superior a 0,990, garantindo a confiabilidade da curva analítica. A precisão foi verificada por meio de repetibilidade e precisão intermediária, ambas dentro dos limites aceitáveis. A exatidão apresentou taxa de recuperação entre 90 e 107%, enquanto a robustez demonstrou que o método suporta pequenas variações operacionais. Os resultados atenderam aos critérios de aceitação, confirmando a validade para ser utilizado em diversas frentes de quantificação deste fármaco.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes. Paracetamol. Cromatografia líquida.

Abstract

The present study developed and validated an analytical method for the Active Pharmaceutical Ingredient (API) paracetamol, based on the requirements of ANVISA's RDC No. 166/2017. The process encompassed steps from solution preparation to analysis using high-performance liquid chromatography. Parameters such as selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness were evaluated. Selectivity was demonstrated through forced degradation, confirming that the method is free from interference by impurities or degradation products. Linearity was validated with a correlation coefficient greater than 0.990, ensuring the reliability of the analytical curve. Precision was verified through repeatability and intermediate precision, both within acceptable limits. Accuracy showed a recovery rate ranging from 90% to 107%, while robustness demonstrated that the method tolerates small operational variations. The results met the acceptance criteria, confirming the method's validity for use in various quantification applications for this pharmaceutical compound.

Keywords: *Emerging contaminants. Acetaminophen. Liquid chromatography.*

1 Introdução

O estudo dos contaminantes emergentes tornou-se um tema de grande relevância científica nas últimas décadas, motivado por sua crescente detecção em diferentes meios ambientais, como água, solo e ar. Esses compostos, provenientes de fontes antrópicas (efluentes domésticos, industriais, hospitalares e práticas agrícolas) ou naturais, não são normalmente monitorados em programas de rotina, mas podem representar riscos significativos ao meio ambiente e à saúde humana (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017).

Entre os compostos preocupantes, destacam-se os disruptores endócrinos, que interferem no sistema hormonal e podem causar efeitos adversos como infertilidade e aumento do risco de certos tipos de câncer. Alguns dos contaminantes emergentes mais comuns incluem medicamentos de uso humano, como o paracetamol, cujo uso extensivo e descarte inadequado contribuem para sua presença em águas residuais (Farto *et al.*, 2021).

Para analisar esses contaminantes, técnicas avançadas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são amplamente utilizadas devido à sua precisão e sensibilidade. A validação de métodos analíticos segue rigorosos parâmetros estabelecidos pela legislação, como os da ANVISA, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados obtidos em estudos ambientais e de saúde pública (Brasil, 2022).

Este trabalho propõe validar um método de análise cromatográfico para o paracetamol que possa ser utilizado em diversas frentes de quantificação deste fármaco, tanto para a indústria farmacêutica quanto na investigação como um contaminante emergente.

2 Fundamentação Teórica

2.1 Contaminantes emergentes

O tema dos contaminantes emergentes ganhou bastante foco nesta última década e vem ganhando diferentes tipos de abordagens por cientistas e pesquisadores de todo o mundo em vários aspectos. São muitos compostos que vêm sendo identificados e detectados nos diferentes tipos ambientais que possuímos sendo eles o solo, a água e o ar, podendo vir tanto de origem antrópica que são aqueles oriundos de efluentes domésticos,

industriais, hospitalares e de atividades agrícolas e pecuárias, quanto de origem natural como as plantas. Os compostos contaminantes emergentes não fazem parte de programas de monitoramento de rotina, porém podem apresentar riscos ao ecossistema, com isso, a tendência é que em breve eles sejam regulamentados e inclusos na legislação dependendo dos resultados feitos em estudos a danos ambientais (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017).

Alguns contaminantes emergentes são considerados como disruptores endócrinos (DEs), são compostos que bloqueiam as ações dos hormônios naturais. Eles se ligam aos receptores celulares modificando as suas respostas normais, este efeito pode ocorrer tanto em seres humanos como também em animais, causando a queda na qualidade do sêmen, a infertilidade, diabetes e o aumento nas chances de se ter câncer de mama, de testículo e próstata. Existem duas preocupações sobre os contaminantes emergentes presentes nas águas brasileiras, o primeiro é a exposição da biota e dos seres humanos a estes compostos e o segundo é a possibilidade de contaminação de mananciais de água bruta. Como muitos destes compostos são de difícil degradação, o tratamento comum de águas para o abastecimento não retira estes contaminantes que podem acabar afetando a qualidade da água tornando um problema bem maior. Por fim um último aspecto preocupante é as práticas agrícolas intensivas, que acabam contaminando o solo podendo resultar na infiltração de poluentes, que alcançam tanto as águas superficiais quanto as subterrâneas (Farto *et al.*, 2021).

2.2 Tipos de contaminantes emergentes

O conceito de contaminantes emergentes conta com uma ampla variedade de compostos que são oriundos de diversas áreas que são exercidas pelas atividades humanas. Existem sete grupos principais de onde se originam estes compostos, sendo eles pesticidas e praguicidas, surfactantes, retardadores de chama e fogo, drogas ilícitas, produtos de higiene pessoal, produtos para o tratamento de água e produtos farmacêuticos. Há um volume muito grande de produtos farmacêuticos que são utilizados pela população, como por exemplo analgésicos como o ibuprofeno e o paracetamol, que são medicamentos consumidos em grande escala e usado muito na automedicação, outros medicamentos como anti-hipertensivos e antimicrobianos também são bastante utilizados em todo o mundo, com isso, acabam por ser lançados nos meios aquáticos principalmente por águas residuais como os esgotos (Pachés Giner, 2020).

2.3 Paracetamol

O acetaminofeno ou paracetamol, como é popularmente conhecido, é um composto analgésico e antipirético usado para tratamentos terapêuticos. Ele possui grande solubilidade em água (12,78 mg/mL em temperatura ambiente), tem a sua metabolização principal pelo fígado e é excretado pelos rins, com isso, o meio de transporte mais comum para ele no meio ambiente é pelas águas residuais. Mesmo o paracetamol sendo considerado seguro para o consumo humano, se for consumido em grandes quantidades pode causar toxicidade hepática (Peñalver Romero, 2020).

A participação do paracetamol como contaminante emergente aponta concentrações variáveis em ambientes aquáticos ao redor do mundo. Estudos indicam que a concentração de paracetamol em águas residuais e corpos d'água pode variar de 0,1 a 300 µg/L, esta concentração medida no ambiente pode ser significativa se comparada com os níveis que não causam efeitos. Este nível para o paracetamol foi estabelecido em 12,9 µg/L além de que este risco pode ser elevado em áreas com altos níveis de descarte inadequado de medicamentos (Shipingana; Shivaraju; Yashas, 2022).

2.4 Métodos de análise para os contaminantes emergentes

Os métodos de análise para detectar os fármacos contaminantes emergentes em amostras ambientais são bem específicos sendo eles a extração em fase-sólida, cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores ultravioleta com suas derivações (Danieli, 2022).

A extração em fase-sólida é um método eficiente de analisar amostras. Parecido com o método de extração líquido-líquido a extração em fase-sólida possui os mesmos princípios. A amostra líquida a ser analisada passa por partículas adsorventes onde os analitos tem maior afinidade do que o líquido a granel. Após isso os analitos são extraídos por eluição a partir de um solvente apropriado de acordo com a amostra. Esta técnica de preparação de amostras passou a ser amplamente utilizada em diversas aplicações analíticas ambientais, sendo incorporada gradualmente em procedimentos padronizados ao longo da última década. Como resultado, a extração em fase-sólida tornou-se bem conhecida por um vasto público no campo da análise (Badawy, 2022).

A cromatografia é uma técnica de separação e análise de substâncias em uma mistura, muito usada em química analítica. Ela funciona com base nas diferentes

velocidades de deslocamento dos componentes de uma mistura, ao passarem por um meio estacionário (fixo) e outro móvel (líquido ou gás). Cada componente da mistura interage de forma diferente com o meio estacionário, o que resulta em tempos de retenção variados e possibilita a separação. Existem várias técnicas de cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (GC), cada uma adequada para diferentes tipos de amostras e condições experimentais (Grinberg, 1990).

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Devido a sua alta resolução, seletividade e capacidade de detecção, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica bastante utilizada no desenvolvimento de métodos analíticos e estudos de identificação. Essa técnica foi introduzida na década de 1960, aprimorada nos anos 1970 e passou a ser amplamente aplicada principalmente na avaliação de estabilidade e identificação de produtos farmacêuticos. Entre os diversos tipos de detectores que podem ser acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os espectrofotômetros de absorção no ultravioleta (UV) são os mais comumente usados em análises farmacêuticas, sendo disponíveis nas variantes de comprimento de onda variável ou de DAD (detector de arranjo em diodos). Com esse tipo de detector, é possível gerar cromatogramas em diferentes comprimentos de onda a partir de uma única corrida, obter espectros de varredura na região UV dos picos cromatográficos individuais e, ainda, determinar a homogeneidade espectral de cada pico, o que indica a ausência de coeluições (teste de pureza do pico) (Facci *et al.*, 2020).

2.6 Validação de Métodos

Segundo a RDC 166/2017, validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente é consistente e leva aos resultados esperados. O objetivo de uma validação analítica é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, isto é, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias relacionadas em produtos farmacêuticos. Os parâmetros preconizados, que devem ser seguidos no processo de validação, constam no documento oficial da ANVISA: RDC nº 166/2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Para a aprovação final o método desenvolvido e validado no laboratório deve ser capaz de atender os parâmetros mínimos exigidos pela resolução (Brasil, 2022).

2.7 Parâmetros avaliados no processo de validação de métodos

De acordo com a RDC nº 166/2017, para métodos quantitativos e de ensaio limite, a seletividade deve ser demonstrada através da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou produtos de degradação. Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, é necessário expor a amostra a condições de degradação forçada em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor, umidade e de luz. Para análise quantitativa, a linearidade será determinada pela realização de uma curva com pontos equidistantes no intervalo entre o 80% até 120% da concentração de trabalho, através da análise de no mínimo 5 concentrações diferentes do analito. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade ou precisão intercorrida, é a concordância entre os resultados dentro de um curto período com o mesmo analista e a mesma instrumentação. É verificada por no mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste, preparadas de forma independente desde o início do processo. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento de análise (Brasil, 2017).

3 Metodologia

O estudo foi realizado em um laboratório de insumos farmacêuticos (LAIF) vinculado a Pontifícia universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) na cidade de Porto Alegre – RS. O LAIF tem como foco de atuação a avaliação e caracterização de matérias-primas e insumos farmacêuticos. Desta forma, apoia o desenvolvimento tecnológico e industrial do setor farmacêutico e farmoquímico, atendendo tanto a indústrias públicas quanto privadas. São dotados de uma grande variedade de equipamentos que permite a realização dos ensaios clássicos de controle de qualidade e de ensaios para a determinação de características físicas e de propriedades mecânicas,

necessárias ao desenvolvimento de novas formulações (LAIF, 2024).

O presente estudo abordou o desenvolvimento para a validação de um método analítico para o IFA de paracetamol cedido por um cliente do LAIF, com o objetivo de atestar que o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, realmente é consistente levando a resultados esperados. Essas etapas incluíram desde o preparo de soluções até o tratamento dos resultados obtidos experimentalmente.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado para os ensaios de desenvolvimento e validação foi o *Shimadzu LC-20AT Prominence*. O padrão de paracetamol (Acetaminofeno) utilizado nos ensaios foi o *Sigma-Aldrich* (Lote: LRAD6514, Pureza: 99,99%).

3.1 Preparo da fase móvel e soluções de trabalho

Para as análises cromatográficas foram necessárias o preparo de duas soluções de fase móvel sendo elas A e B, onde ambas foram adaptadas a partir de uma monografia da farmacopeia americana. A fase móvel A foi preparada a partir de uma solução contendo 1,7 g/L de fosfato de potássio monobásico e 1,8 g/L de fosfato de sódio dibásico anidro. Após o preparo feito, a solução resultante passou por uma filtração a vácuo utilizando um filtro de membrana com porosidade de 0,45 µm. A fase móvel B é composta apenas por Acetonitrila grau HPLC e não necessita passar por nenhum tipo de filtração.

Para o preparo da solução padrão estoque foi utilizado o padrão de paracetamol em uma concentração de 0,1 mg/mL e utilizado metanol grau HPLC como diluente por ser muito solúvel. Em seguida foi preparado a solução padrão de paracetamol a partir da solução padrão estoque onde a concentração da solução é de 0,02 mg/mL de padrão de paracetamol utilizando como diluente a fase móvel A, pois facilita a separação cromatográfica dentro da coluna.

Para o preparo da amostra do IFA paracetamol foram feitas duas soluções, a primeira solução é a de amostra estoque onde foi adicionado o IFA paracetamol em uma concentração de 0,1 mg/mL e usado o metanol grau HPLC como diluente por ser muito solúvel. Em seguida foi preparado a solução amostra do IFA paracetamol com uma concentração de 0,02 mg/mL e utilizando como diluente a fase móvel A, pois facilita a separação cromatográfica dentro da coluna.

3.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para os ensaios de análise de identificação e teor do IFA paracetamol estão descritas conforme a tabela 1. O comprimento de onda de 246 nm foi selecionado a partir de uma varredura entre 190 e 400 nm dentro do UV acoplado ao CLAE, como o detector utilizado na análise é DAD, foi possível verificar pureza e intensidade do pico cromatográfico do paracetamol dentro dos comprimentos de onda selecionados na região do UV, sendo possível selecionar o comprimento de onda com maior intensidade e pureza de pico.

Tabela 1 – Condições cromatográficas para a análise de identificação e teor do paracetamol.

Fase móvel A	Solução A		
Fase móvel B	Acetonitrila grau HPLC		
Coluna	C18 - 250 mm x 4,6 mm x 5 µm		
Temperatura da coluna	40 °C		
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/min		
Volume de injeção	25 µL		
Detector	Arranjo de diodos (DAD)		
Comprimento de onda de leitura	246 nm		
Gradiente	Tempo	Fase móvel A	Fase móvel B
	0 – 2 min	99%	1%
	2 – 2.5 min	99 → 90%	1 → 10%
	2.5 – 3 min	90 → 85%	10 → 15%
	3 – 3.5 min	85 → 82%	15 → 18%
	3.5 – 4 min	82 → 85%	18 → 15%
	4 – 4.5 min	85 → 90%	15 → 10%
	4.5 – 5.5 min	90 → 99%	10 → 1%
5.5 – 12 min	99%	1%	

Fonte: Os autores (2024).

3.3 Adequabilidade do sistema

A amostra utilizada para os testes de adequabilidade do sistema será a Solução Padrão 0,02 mg/mL. O parâmetro de conformidade do ensaio de adequabilidade do sistema, para seis replicatas, é o desvio padrão relativo (DPR) menor que 0,73% calculado a partir da equação 1.

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (1)$$

Onde:

DPR = Desvio padrão relativo

DP = Desvio padrão

CMD = área média do IFA paracetamol determinada entre as 6 observações

3.4 Parâmetros de desempenho para a validação do método analítico

De acordo com a RDC 166/2017 - Anexo I, os métodos em questão, devem contemplar os parâmetros para a validação analítica apresentados na Tabela 2. Além dos parâmetros listados abaixo, serão avaliadas a adequabilidade do sistema e a robustez para todos os métodos. A seletividade será avaliada mediante a realização da degradação forçada.

Tabela 2 – Parâmetros de validação analítica aplicado para cada metodologia.

Método		
Parâmetro	Identificação	Teor
Seletividade	x	x
Linearidade		x
Exatidão		x
Precisão		
Repetibilidade		x
Precisão Intermediária		x

Fonte: Os autores (2024).

3.5 Seletividade

Pela RDC nº 166/2017 “a seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar e quantificar o analito de interesse inequivocamente na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.” Por esse motivo, opta-se por seguir os parâmetros de degradação forçada para demonstrar e comprovar que a resposta analítica corresponde exclusivamente ao analito sem interferência de impurezas e produtos de degradação.

De acordo com a RDC nº 53/2015, que estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação, os testes de degradação devem promover uma degradação superior a 10 % (diminuição da área do pico principal) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra. Quando tal condição não for alcançada, a empresa deve apresentar justificativa técnica fundamentada.

Os estudos de degradação serão conduzidos conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de degradação.

Estudo	Condição	Tempo de estresse
Degradação Fotolítica	300 Wh/m ²	15,5 h
Degradação Ácida	HCl 1M	24 h
Degradação Básica	NaOH 1M	24 h
Degradação Oxidativa	H ₂ O ₂ 3,5%	16 h
Degradação por temperatura	50 °C	16 h
Degradação por íons metálicos	CuSO ₄ 1M	16 h
Degradação por umidade	23 °C e 85% Umidade relativa	16 h

Fonte: Os autores (2024).

É importante demonstrar o desempenho do método proposto em separar compostos com estruturas que possam estar presentes no cromatograma. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos, preferencialmente em relação ao material de referência conhecido, em amostra contendo o analito de interesse, comparativamente com resultados obtidos a partir da análise de um branco, que não contenha o analito de interesse (placebo). A separação cromatográfica é quantificada através de fatores de resolução que deve ser maior que 1,5, e é calculada através da Equação 2, abaixo:

$$R_S = 1,18 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)} \quad (2)$$

Onde:

R_S = Resolução

t_{R1} e t_{R2} = Tempos de retenção de dois componentes

W_1 e W_2 = Largura dos picos integrados a partir da linha de base

3.6 Linearidade

Ao realizar uma determinação de linearidade, é necessário garantir que os resultados gerados pelo modelo ajustado sejam confiáveis. Essa comprovação exige uma avaliação estatística completa e rigorosa de todas as medidas de um conjunto de dados,

antes de aprová-los como as determinações necessárias para elaborar uma curva de calibração. Sendo assim, a avaliação estatística da linearidade contemplará as seguintes etapas:

- Avaliação de Resíduos

A avaliação de resíduos pode ser realizada com um conjunto de técnicas gráficas (informais) e técnicas formais, a fim de comprovar:

- Normalidade dos resíduos (Anderson-Darling);
- Homoscedasticidade do método (Breusch-Pagan);
- Independência dos resíduos (Durbin-Watson);
- Valores aberrantes – Outliers (Grubbs).

O uso combinado dessas técnicas com os gráficos, permite um amplo entendimento das determinações não válidas na curva de calibração. Além disso, a avaliação da homoscedasticidade do método é essencial para realizar a correta estimativa do modelo de regressão linear e posterior avaliação estatística da validade dos resultados.

- Homoscedasticidade:

Caso haja homogeneidade entre as variâncias (homoscedasticidade), a avaliação de significância dos parâmetros pode ser realizada com um método estatístico paramétrico (ex. ANOVA), e a regressão linear pode ser realizada através do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Caso não haja homogeneidade entre as variâncias (heterocedasticidade), a avaliação de significância dos parâmetros deve ser realizada com algum outro método estatístico não paramétrico, e a regressão linear deve ser realizada com o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) para o ajuste mais adequado do modelo.

- Regressão Linear e Determinação da Curva de Calibração:

Tendo comprovado a validade dos resultados coletados e o comportamento desses, é possível então fazer a determinação da curva analítica, plotando a equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados e fazendo a avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de

determinação (r^2).

A relação linear é comprovada com o exame visual do gráfico plotado e com o valor do coeficiente de correlação adequado (acima de 0,990). Além dessas verificações, é necessário comprovar a significância do coeficiente angular (inclinação) e se o seu valor é significativamente diferente de zero para um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

- Significância do Coeficiente Linear (Intercepto):

A avaliação do coeficiente linear pode trazer informação importante e será realizada através de teste t, se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero. Caso seja encontrado intercepto estatisticamente diferente de zero e com magnitude significativa frente às respostas analíticas, é recomendável que se utilize uma curva de calibração ao invés de um ponto único para padronização na rotina de análise.

Para o critério de aceitação, os testes devem atender alguns requisitos sendo eles: todos os testes estatísticos devem ser avaliados com um intervalo de confiança de 5% ($\alpha=0,05$); os resíduos gerados devem apresentar distribuição normal, independente e aleatória, a equação da reta de regressão deve ser estimada pelo método dos mínimos quadrados e a sua análise de regressão deve fornecer um coeficiente de correlação linear (r) superior a 0,990; o coeficiente angular deve ter a significância avaliada e possuir um valor significativamente diferente de zero ($\alpha=0,05$); devem ser apresentados gráficos da dispersão dos resíduos e da curva da resposta em função da concentração do analitos.

3.7 Precisão Repetibilidade

A repetibilidade será verificada através de 6 determinações na concentração correspondente à concentração de trabalho. Pode ser expressa como o desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas. Submeter estas amostras à análise utilizando as condições cromatográficas descritas no item 3.2. Calcular o DPR dos analitos determinado entre as 6 amostras analisadas, utilizando a Equação 1:

Os critérios de aceitação para repetibilidade estão associados à faixa de concentração. A Tabela 4 mostra os valores esperados de recuperação em função da concentração do analito na amostra:

Tabela 4 – Valores de precisão esperados em função da concentração do analito.

Analito (%)	Fração mássica (C)	Unidade	Desvio Padrão relativo (%)
100	1	100%	1,3
10	10-1	10%	1,9
1	10-2	1%	2,7
0,1	10-3	0.1%	3,7
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: AOAC (2016).

O DPR dos resultados de área, determinados a partir de preparações independentes entre as replicatas deve estar abaixo do valor tabelado estabelecido em função da concentração do analito na concentração alvo do teste.

3.8 Precisão Intermediária

A precisão intermediária deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos contemplando as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Para a avaliação da precisão serão preparadas 6 amostras distintas na concentração correspondente à concentração de trabalho. Submeter estas amostras a análise utilizando as condições cromatográficas descritas no item 3.2. Calcular o DPR do ativo determinado entre as 6 amostras analisadas.

Será verificada a homoscedasticidade do parâmetro através do Teste de Cochran. A fórmula utilizada para o cálculo do $C_{calculado}$, encontra-se na equação 3 abaixo. Caso a precisão intermediária se apresente homocedástica, também será realizado tratamento estatístico paramétrico por análise de variância – ANOVA fator duplo sem repetição – uma vez que este teste é adequado para predizer se existe ou não diferença estatisticamente significativa dos valores encontrados entre os diferentes dias de análise, realizados por analistas distintos (Cochran, 1977).

$$n_0 = \frac{Z^2 \times p \times (1 - p)}{E^2} \quad (3)$$

Onde:

n_0 = tamanho da amostra necessária

Z = valor da distribuição normal padrão associado ao nível de confiança desejado (para 95% de confiança)

p = proporção estimada da população

E = margem de erro desejada

Se o resultado da análise de Cochran demonstrar comportamento não homocedástica, os dados devem ser avaliados através de métodos não paramétricos, como, por exemplo, o teste de Kruskal-Wallis. O teste será realizado para um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Para sabermos se existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras, será avaliado o p-valor. Se esse valor for maior que o nível de significância de 0,05, conclui-se que não existe diferença estatística significativa entre as análises. Outra forma de se concluir sobre o teste é fazer a comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$. Se $F_{\text{calculado}}$ for menor que o $F_{\text{crítico}}$ pode-se dizer que não existem diferenças significativas, na média, entre as análises.

3.9 Exatidão

Para a análise da exatidão será utilizado o método de adição de padrão, na qual serão adicionadas quantidades conhecidas de padrão de referência na amostra a ser analisada. Serão adicionadas a amostra (em triplicata) quantidades de padrão referentes às concentrações baixa, média e alta da curva analítica do analito.

As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe. As amostras serão submetidas as condições cromatográficas descritas no item 3.2. Calcula-se a concentração recuperada do analito e usa-se esta concentração determinada experimentalmente para o cálculo da porcentagem recuperada, utilizando a Equação 3.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{CME \times 100}{CT} \quad (3)$$

Onde:

CME = Concentração experimental

CT = Concentração teórica

Os critérios de aceitação para exatidão estão associados à faixa de concentração. A Tabela 5 mostra os valores esperados de recuperação em função da concentração do analito na amostra:

Tabela 5 – Valores de exatidão esperado em função da concentração do analito.

Analito (%)	Fração mássica (C)	Unidade	Recuperação média (%)
100	1	100%	98-102
10	10 ⁻¹	10%	
1	10 ⁻²	1%	97-103
0,1	10 ⁻³	0.1%	95-105
0,01	10⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40-120

Fonte: AOAC (2016).

A taxa de recuperação deve estar dentro do intervalo estabelecido pela faixa da concentração de trabalho do método analítico e o DPR entre os resultados percentuais de área determinados entre as diferentes amostras devem ser menores que os valores estabelecidos pela faixa de concentração de trabalho.

3.10 Robustez

Para a avaliação da robustez da metodologia analítica será testada a influência dos diversos fatores críticos no desenvolvimento do método. Serão preparadas amostras de padrão de paracetamol, no nível de concentração 100% do teste, de acordo com item 3.1, e analisadas alterando parâmetros da metodologia validada.

Os parâmetros previamente definidos para serem testados, podendo variar de acordo com o desenvolvimento do método, são os seguintes:

- Variação da concentração de fosfato de potássio monobásico na fase móvel A ($\pm 1\%$).
- Variação do fluxo de fase móvel ($\pm 0,1$ mL/min).
- Variação da composição de Fase móvel ($\pm 1\%$ de proporção da fase móvel B em todos os pontos do gradiente).

- Variação da temperatura do forno ($\pm 1^\circ\text{C}$).
- Variação do lote da coluna.

O impacto dos valores obtidos nos ensaios de robustez deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados nos testes da exatidão.

4 Resultados e discussões

4.1 Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi calculada através da equação 1. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Análise do DPR.

Amostra	Replicatas	Área (mAU)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
SS - 1	1	2000592			
SS - 2	2	2002826			
SS - 3	3	2002754	2002792,167	2814,76	0,14
SS - 4	4	2001145			
SS - 5	5	2008228			
SS - 6	6	2001208			

mAU: Milésimos de Unidade por Absorbância.

Fonte: Os autores (2024).

Conforme é mostrado na tabela 6 é possível observar que a partir dos resultados de área obtidos no ensaio cromatográfico o paracetamol apresentou um DPR obtido menor que 0,73% assim indicando que o sistema cromatográfico está apto para operar e seguir o desenvolvimento da validação.

4.2 Seletividade

Os valores de seletividade foram analisados conforme resultados obtidos no estudo de degradação forçada. Duas das condições avaliadas apresentaram valores superiores à 10% em perda de teor, comparado com a amostra controle. Pode ser observado que nas condições de estresse ácida e na básica, foram visualizados produtos de degradação ao longo do cromatograma. Na tabela 7 são apresentados os dados referentes a esse estudo.

Tabela 7 – Análise de degradação.

Estudo	Área do paracetamol (mAU)	Área do PD (mAU)	Perda de teor (%)	Resolução
Amostra controle	2444257			-
Degradação Fotolítica	2342858	-	0	-
Degradação Ácida	1816539	118790	25,69	6,131
Degradação Básica	1325167	81793	45,79	5,202
Degradação Oxidativa	2558359	-	0	-
Degradação por temperatura	2540095	-	0	-
Degradação por íons metálicos	2475358	-	0	-
Degradação por umidade	2346070	-	0	-

PD: Produto de degradação.

mAU: Milésimos de Unidade por Absorbância.

Fonte: Os autores (2024).

Conforme apresentado na tabela 7, é possível observar que o método é seletivo pois os produtos de degradação formados apresentam resolução maior que 1,5, conforme consta na metodologia proposta. E não há interferência de produtos de degradação, diluente, ou outros compostos que possam ter na solução do analito, na quantificação do ativo, paracetamol.

4.3 Linearidade

Os testes estatísticos de linearidade foram feitos a partir de uma curva de calibração com concentrações de trabalho conhecidas entre 80 e 120% sendo que cada concentração possui 3 replicatas conforme é apresentado na tabela 8.

Tabela 8 – Curva de calibração.

Preparação	Concentração (mg/mL)	Resultado Bruto (Área) (mAU)
LN1 80%	0,016	1889310
LN2 80%	0,016	1899828
LN3 80%	0,016	1813648
LN1 90%	0,018	2126009
LN2 90%	0,018	2073915
LN3 90%	0,018	2017073
LN1 100%	0,020	2363867
LN2 100%	0,020	2292202
LN3 100%	0,020	2229378
LN1 110%	0,022	2562804
LN2 110%	0,022	2519425
LN3 110%	0,022	2467800
LN1 120%	0,024	2748766
LN2 120%	0,024	2701670
LN3 120%	0,024	2681140

mAU: Milésimos de Unidade por Absorbância.

Fonte: Os autores (2024).

A partir dos resultados obtidos, os valores de área e concentração foram colocados no *software Action Stat Versão 3.7*, afim de que fosse feita a análise estatística conforme exigido pela RDC n° 166/2017 e recomendados pelo Guia 10 da ANVISA para tratamentos estatísticos da validação analítica. Os resultados gerados pelo software contemplaram as exigências propostas pela ANVISA e citadas no item 3.6, sendo aprovados em todos os parâmetros estatísticos estabelecidos. O tratamento estatístico completo se encontra no Anexo A.

4.4 Precisão Repetibilidade e Intermediária

A avaliação dos resultados de precisão foi feita a partir de uma curva de calibração e uma concentração conhecida de 20 ppm, onde em dois dias diferentes cada analista repetiu o mesmo processo preparando 6 amostras referentes à concentração de trabalho. O DPR para ambas as precisões ficou abaixo da faixa estabelecida de 5,3%, sendo assim, encontram-se dentro do critério de aceitação. Na tabela 9 são apresentados os dados da análise.

Tabela 9 – Valores de DPR da precisão.

Preparação	Concentração Teórica (ppm)	Concentração Encontrada (ppm)	Analista / Dia	DPR%	Resultado Bruto (Área) (mAU)
Paracetamol - Dia 1 - A1	20,00	0,017	1	1,95	2000592,00
Paracetamol - Dia 1 - A2	20,00	0,018	1		2082826,00
Paracetamol - Dia 1 - A3	20,00	0,017	1		2002754,00
Paracetamol - Dia 1 - A4	20,00	0,018	1		2061145,00
Paracetamol - Dia 1 - A5	20,00	0,017	1		2008228,00
Paracetamol - Dia 1 - A6	20,00	0,017	1		2001208,00
Paracetamol - Dia 2 - A1	20,00	0,021	2	1,17	2368910,00
Paracetamol - Dia 2 - A2	20,00	0,020	2		2321825,00
Paracetamol - Dia 2 - A3	20,00	0,020	2		2342588,00
Paracetamol - Dia 2 - A4	20,00	0,020	2		2322231,00
Paracetamol - Dia 2 - A5	20,00	0,020	2		2305377,00
Paracetamol - Dia 2 - A6	20,00	0,020	2		2300648,00

mAU: Milésimos de Unidade por Absorbância.

ppm: Partícula por milhão.

Fonte: Os autores (2024).

Outro parâmetro avaliado foi a homoscedasticidade pelo teste de Cochran onde o $C_{calculado}$ (0,6721) deve ser menor que o $C_{tabelado}$ (0,8772), com isso o resultado é homocedástico estando dentro dos critérios de aceitação.

4.5 Exatidão

Para os valores de exatidão o critério de aceitação mostra que a taxa de recuperação média do analito deve ser de 90 a 107% conforme a tabela 5, e o DPR deve ser menor que 5,3% conforme mostrado na tabela 4, observando os resultados na tabela 10 é possível ver que estes critérios de aceitação foram atendidos mostrando que o método é exato.

Tabela 10 – Valores de DPR e recuperação média do analito.

Preparação	Concentração Adicionada (mg/ml)	Concentração Encontrada (mg/ml)	Resultado Bruto (Área) (mAU)	Teor (%)	DPR
Branco A1	0,00	0,018	2183789	0,00	
Branco A2	0,00	0,019	2301314	0,00	-
Branco A3	0,00	0,019	2280172	0,00	
Exatidão 80% - A1	0,016	0,035	4156659	103,13	
Exatidão 80% - A2	0,016	0,035	4208659	99,70	1,74
Exatidão 80% - A3	0,016	0,035	4235597	102,22	
Exatidão 100% - A1	0,020	0,039	4634934	102,50	
Exatidão 100% - A2	0,020	0,039	4712064	100,82	0,88
Exatidão 100% - A3	0,020	0,039	4699747	101,18	
Exatidão 120% - A1	0,024	0,042	5050782	99,91	
Exatidão 120% - A2	0,024	0,043	5142127	99,00	0,62
Exatidão 120% - A3	0,024	0,043	5154602	100,17	

mAU: Milésimos de Unidade por Absorbância.

Fonte: Os autores (2024).

4.6 Robustez

A robustez foi avaliada conforme critérios estabelecidos no item 3.10, afim de avaliar se a metodologia desenvolvida consegue sofrer pequenas variações em condições de preparo e cromatográficas diferentes, sem que impactasse de forma significativa na análise cromatográfica. Conforme RDC n° 166/2017, a condição avaliada na robustez, não precisa necessariamente ser aprovada, mas sim, testada. Conforme tabela 11, é possível observar que a maior parte das condições testadas, foram aprovadas na robustez, tendo apenas duas reprovações, que foram a variação de -0,1 mL/min no fluxo, e a de gradiente fase móvel B em +1%.

Tabela 10 – Valores de Teor e aceitação de robustez.

Preparação	Teor (%)	Aceitação
IFA - Temperatura - A1	100,84	Aprovado
IFA - Temperatura - A2	101,02	Aprovado
IFA - Temperatura - A3	100,94	Aprovado
IFA - Temperatura + A1	101,15	Aprovado
IFA - Temperatura + A2	101,52	Aprovado
IFA - Temperatura + A3	100,96	Aprovado
IFA - Fluxo - A1	111,20	Reprovado
IFA - Fluxo - A2	111,52	Reprovado
IFA - Fluxo - A3	111,35	Reprovado
IFA - Fluxo + A1	92,00	Aprovado
IFA - Fluxo + A2	92,45	Aprovado
IFA - Fluxo + A3	92,31	Aprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B - A1	102,31	Aprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B - A2	101,69	Aprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B - A3	102,28	Aprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B + A1	111,20	Reprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B + A2	111,52	Reprovado
IFA - Gradiente Fase Móvel B + A3	111,35	Reprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico + A1	100,72	Aprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico + A2	101,07	Aprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico + A3	100,92	Aprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico - A1	100,84	Aprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico - A2	100,62	Aprovado
IFA - Fosfato de Potássio Monobásico - A3	100,76	Aprovado
IFA – Coluna Lote: USUXA04012 - A1	93,07	Aprovado
IFA – Coluna Lote: USUXA04012 - A2	94,93	Aprovado
IFA – Coluna Lote: USUXA04012 - A3	94,86	Aprovado
IFA – Coluna Lote: 230412P - A1	93,55	Aprovado
IFA – Coluna Lote: 230412P - A2	93,51	Aprovado
IFA – Coluna Lote: 230412P - A3	93,72	Aprovado

Fonte: Os autores (2024).

5 Conclusão

Neste trabalho, foi realizada a validação de um método analítico para o IFA paracetamol utilizando parâmetros de acordo com a RDC nº 166/2017 da ANVISA. A metodologia empregada desde o preparo das soluções, condições cromatográficas e métodos para o tratamento de dados se mostrou muito satisfatório, com isso, os critérios de aceitação de cada parâmetro de validação proposto ao longo do trabalho estiveram de acordo com os limites que foram apresentados. Assim as características necessárias para a obtenção dos resultados com a qualidade exigida foram atendidas e foi possível concluir que o método é seletivo, sensível, linear na faixa de trabalho determinada, preciso e exato, estando validado e aprovado para o fim que foi proposto.

Agradecimentos

Agradeço a professora Aline Machado Lucas pelo apoio e orientações durante a realização da pesquisa. A minha colega Taís Fagundes pelas dicas e apoio durante todo o desenvolvimento prático do trabalho. A todos os meus colegas do LAIF pelo auxílio durante a realização das atividades. Aos meus pais Cristiane e Cléo por todo incentivo durante a graduação, apoiando emocionalmente e financeiramente. Aos demais amigos e familiares que contribuíram de alguma forma durante essa jornada.

Referências

AOAC International (2016) Appendix F: **Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. Em AOAC Official Methods of Analysis.

BADAWY, Mohamed EI et al. **A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis**. Analytical Sciences, v. 38, n. 12, p. 1457-1487, 2022.

COCHRAN, William G. *Sampling techniques*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1977.

BRASIL, ANVISA, **Resolução RDC nº 166 de 25 de julho de 2017** (D.O.U.- Diário Oficial da União; Publicado em: 25/07/2017 | Edição: 141 | Seção: 1 | Página: 87).

BRASIL, ANVISA, **Resolução RDC nº 658 de 30 de março de 2022** (D.O.U.- Diário Oficial da União; Publicado em: 31/03/2022 | Edição: 62 | Seção: 1 | Página: 320).

DANIELI, Drika. **Avaliação da toxicidade crônica dos contaminantes emergentes diclofenaco resinato e paracetamol frente ao organismo-teste microalga *Desmodesmus subspicatus*: estudo preliminar**. 2022.

FACCI, Julia et al. **Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos**. Química Nova, v. 43, n. 7, p. 959-973, 2020.

FARTO, Cindy Deina et al. **Contaminantes emergentes no Brasil na década 2010-2019—parte I: Ocorrência em diversos ambientes aquáticos**. Revista de Gestão de Água da América Latina, v. 18, n. 2021, 2021.

GRINBERG, Nelu. **Modern thin-layer chromatography**. CRC Press, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Guia 10: tratamento estatístico na validação analítica**. 1. ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2017.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios**. Química nova, v. 40, n. 9, p. 1094-

1110, 2017.

PACHÉS GINER, María Aguas Vivas. **Contaminantes emergentes**. 2020.

PEÑALVER ROMERO, María et al. **Eliminación de los contaminantes emergentes ibuprofeno, diclofenaco y paracetamol mediante procesos de membrana**. 2020.

SHIPINGANA, Loide Ndelimona Ndapandula; SHIVARAJU, Harikaranahalli Puttaiah; YASHAS, Shivamurthy Ravindra. **Quantitative assessment of pharmaceutical drugs in a municipal wastewater and overview of associated risks**. Applied Water Science, v. 12, n. 2, p. 16, 2022.

Anexo A

LINEARIDADE

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

COLETA DE DADOS

A seguir, apresentamos os dados coletados.

<u>Concentracao</u>	<u>mg mL</u>	<u>Resultado</u>	<u>Bruto</u>	<u>Area</u>
	0,016			1889310
	0,016			1899828
	0,016			1813648
	0,018			2126009
	0,018			2073915
	0,018			2017073
	0,02			2363867
	0,02			2292202
	0,02			2229378
	0,022			2562804
	0,022			2519425
	0,022			2467800
	0,024			2748766
	0,024			2701670
	0,024			2681140

Tabela 1: Conjunto de dados para Linearidade.

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS: ESTIMAÇÃO

O Método dos Mínimos Quadrados é uma eficiente estratégia de estimação dos parâmetros da regressão e sua aplicação não é limitada apenas às relações lineares. Nesta seção utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

Teste do Coeficiente Angular

Para avaliar a significância do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: coeficiente angular igual a zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentracao mg mL	1	1361330724484,8	1361330724484,8	653,3389	0
Resíduos	13	27087470930,5333	2083651610,041		

Tabela 2: Tabela da ANOVA

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótese nula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-63080	-37680	-253,7	0	33410	71410

Tabela 3: Análise exploratória (resíduos)

As estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) são respectivamente:

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	162251,6667	84168,9698	1,9277	0,076
Concentracao mg mL	106510200	4166984,9312	25,5605	0

Tabela 4: Coeficientes

	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	-19584,3375	344087,6708
Concentracao mg mL	97507976,3626	115512423,6374

Tabela 5: Intervalo de confiança para os parâmetros

Teste do Intercepto (Coeficiente Linear)

Para avaliarmos o intercepto (coeficiente linear) utilizamos a estatística t de Student. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual a zero;

H1: intercepto diferente de zero.

Como P-valor (0,076) do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%.

Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

Concentracao mg mL	Resultado Bruto Area	Impacto do Coeficiente Linear (%)
0,016	1889310	8,5879
0,016	1899828	8,5403
0,016	1813648	8,9461
0,018	2126009	7,6317
0,018	2073915	7,8234
0,018	2017073	8,0439
0,02	2363867	6,8638
0,02	2292202	7,0784
0,02	2229378	7,2779
0,022	2562804	6,331
0,022	2519425	6,44
0,022	2467800	6,5747
0,024	2748766	5,9027
0,024	2701670	6,0056
0,024	2681140	6,0516

Tabela 6: Tabela Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

Coeficiente de Correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa e a variável resposta.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	Coefficiente de Correlação
45647,0329	13	0,9805	0,9902

Tabela 7: Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste

Como o coeficiente de correlação (0,9902) é maior que 0,990 (conforme especificado), concluímos que existe uma relação linear adequada.

ANÁLISE GRÁFICA

Diagrama de Dispersão

O diagrama de dispersão é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas.

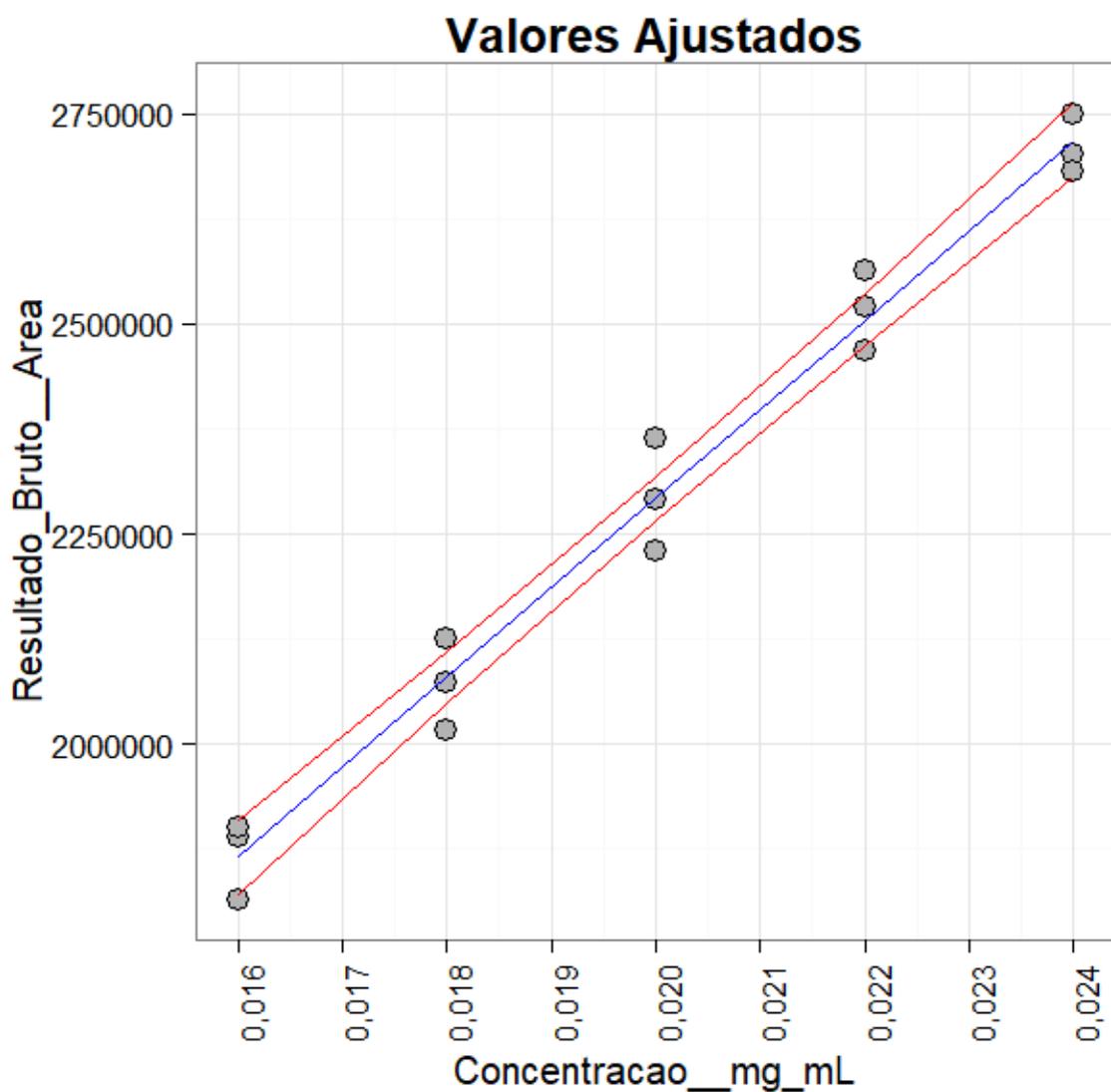


Figura 1: Diagrama de Dispersão

DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS DO MODELO.

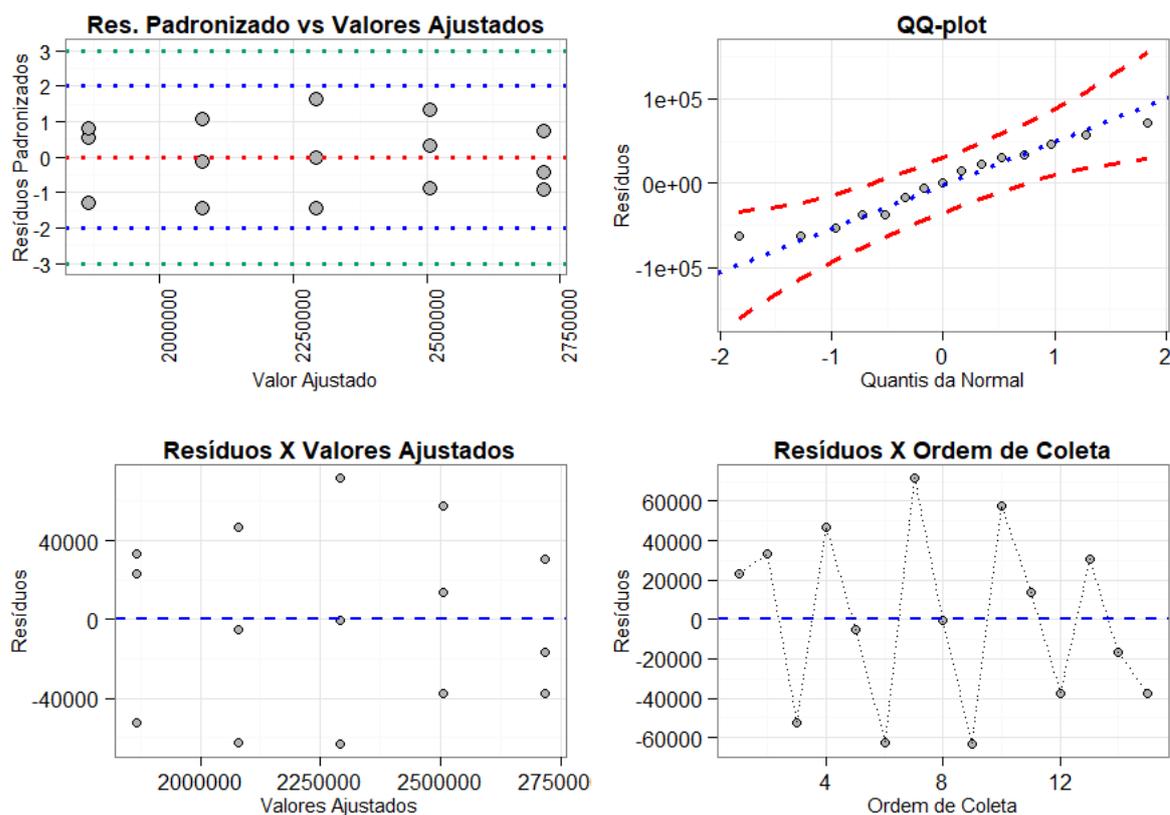


Figura 2: Gráfico da Análise dos Resíduos.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,2482	0,7011

Tabela 8: Teste de Normalidade

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Como P-valor (0,7011) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

AVALIAÇÃO DA HOMOCEDESTICIDADE: TESTE DE BREUSCH PAGAN

Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de hipóteses:

H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Breusch Pagan.

	Estatística	GL	P-valor
	0,3114	1	0,5768

Tabela 9: Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan

Como P-valor (0,5768) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

VALORES EXTREMOS NA RESPOSTA

Nesta seção, vamos avaliar os valores extremos na resposta. Para isto, avaliamos os resíduos padronizados e os resíduos studentizados.

Resíduos

Como critério, será considerado valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

N.Obs	Concentracao__mg_mL	Resíduos	Resíduos Studentizados	Resíduos Padronizados
1	0,016	22895,1333	0,5454	0,5608
2	0,016	33413,1333	0,8074	0,8184
3	0,016	- 52766,8667	-1,3301	-1,2924
4	0,018	46573,7333	1,0826	1,0755
5	0,018	-5520,2667	-0,1226	-0,1275
6	0,018	- 62362,2667	-1,5092	-1,4401
7	0,02	71411,3333	1,7413	1,6193
8	0,02	-253,6667	-0,0055	-0,0058
9	0,02	- 63077,6667	-1,4971	-1,4304
10	0,022	57327,9333	1,3674	1,3238
11	0,022	13948,9333	0,3107	0,3221
12	0,022	- 37676,0667	-0,8613	-0,87
13	0,024	30269,5333	0,7279	0,7414
14	0,024	- 16826,4667	-0,3986	-0,4121
15	0,024	- 37356,4667	-0,9088	-0,915

Tabela 10: Tabela de Resumo da Análise dos Resíduos

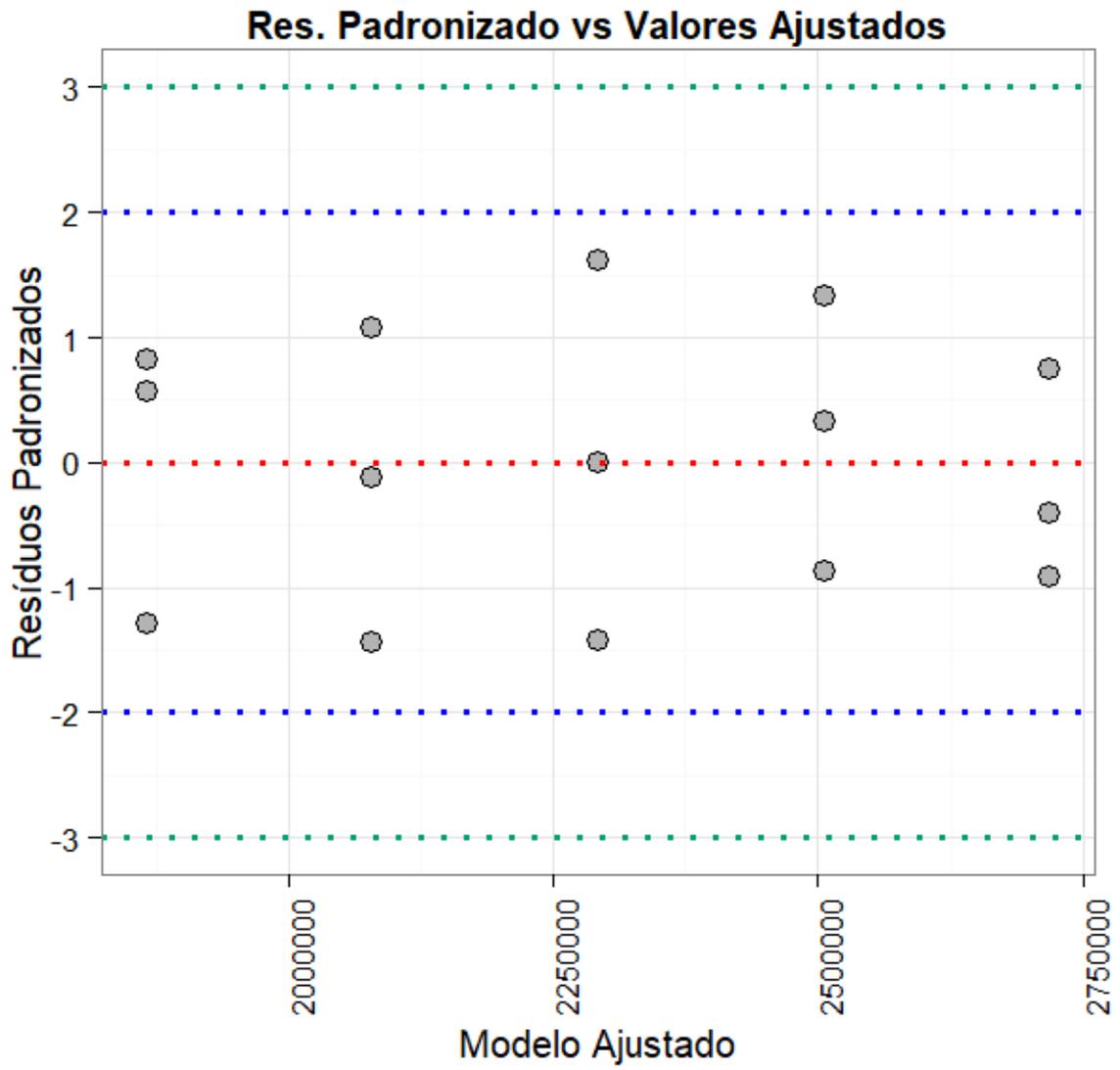


Figura 3: Análise dos Resíduos (Padronizados).

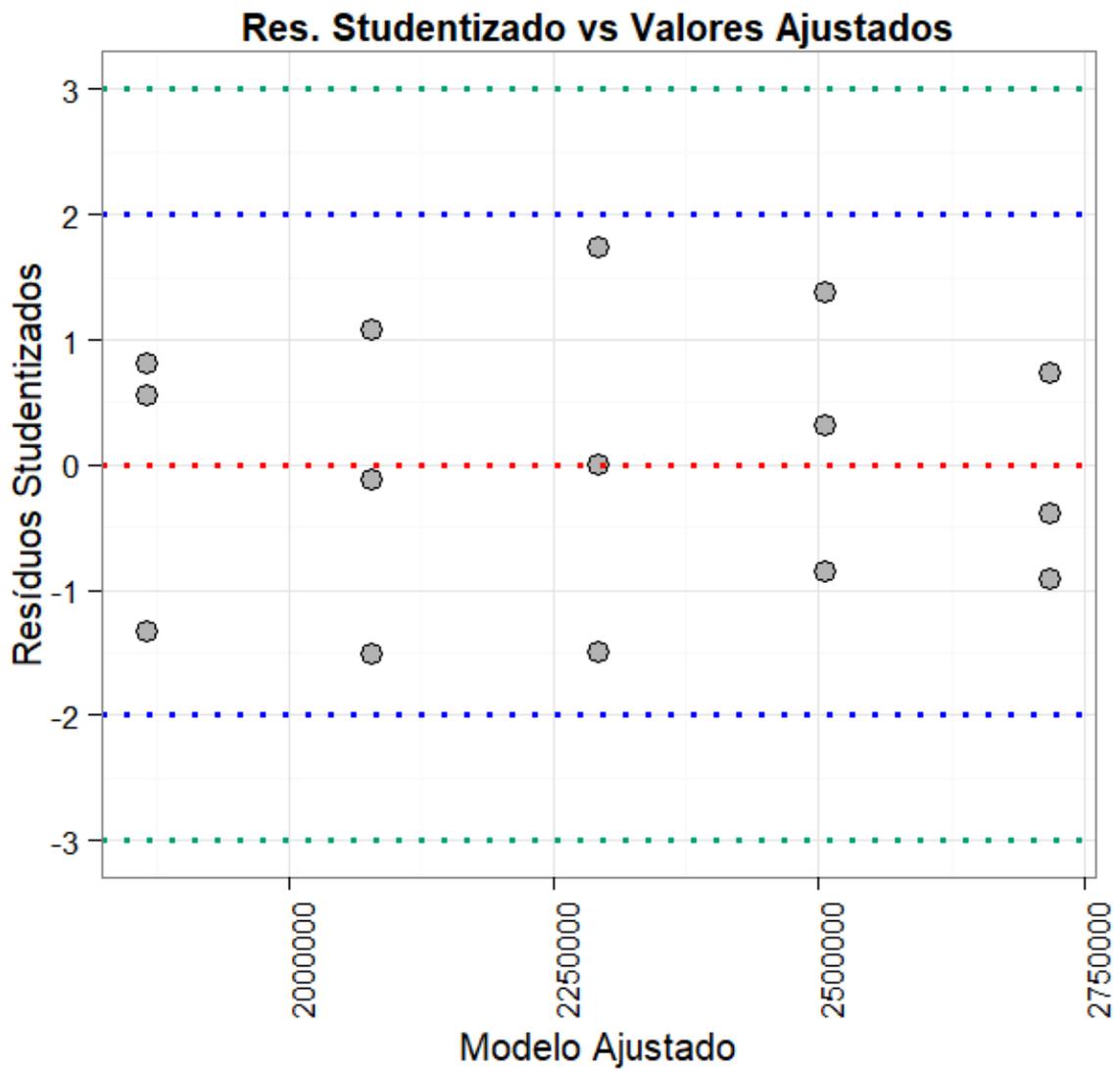
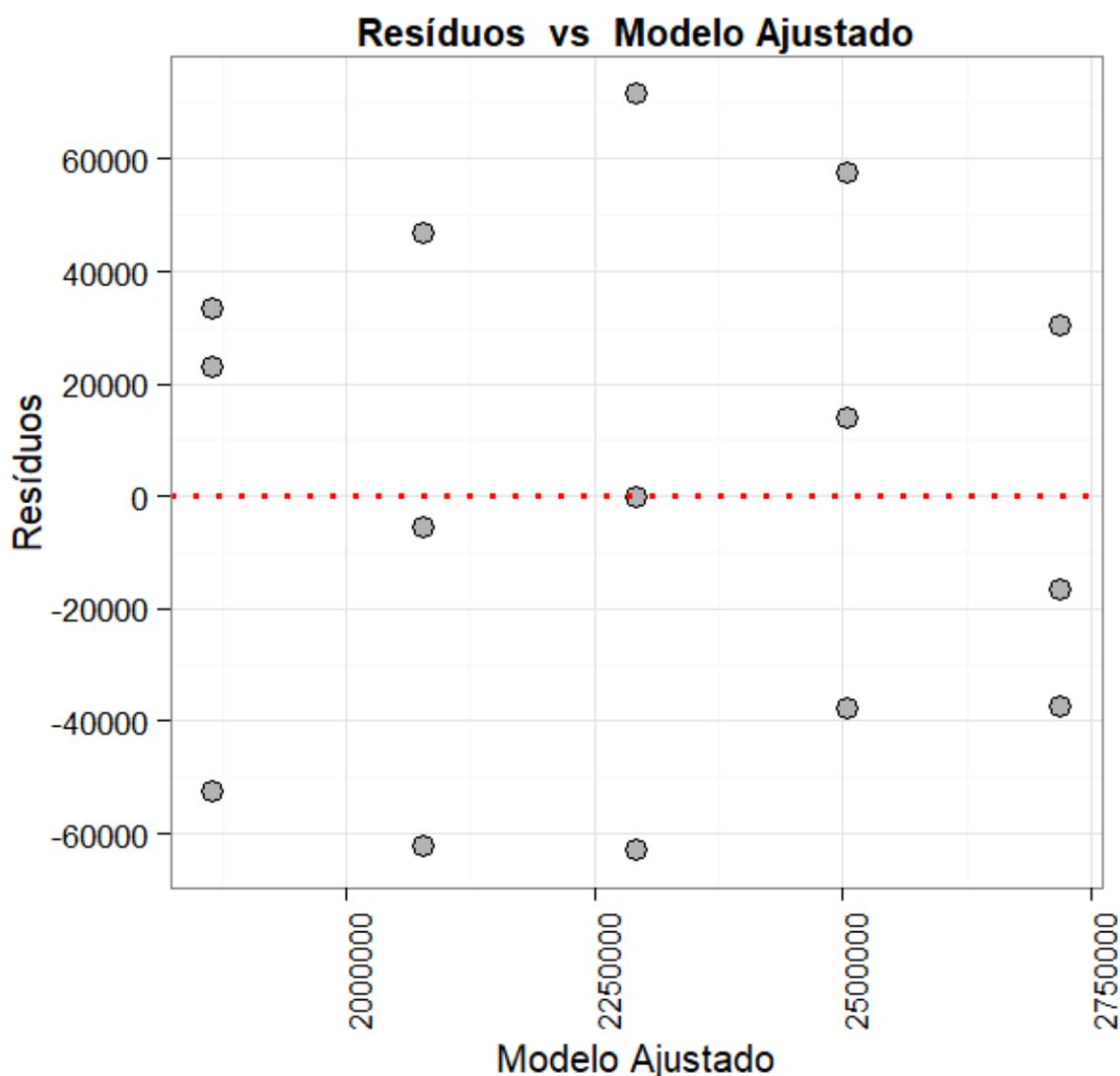


Figura 4: Análise dos Resíduos (Studentizados).



Neste item podemos observar dos gráficos Res. Padronizado vs Valores Ajustados Res. Studentizado vs Valores Ajustados que não foi detectado valores extremos.

PONTOS INFLUENTES

Um ponto é influente se sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial nos valores ajustados. A seguir, apresentamos três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados por:

Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 * \text{raiz} ((p+1)/n)$	0,73
DCOOK	$4/n$	0,2667
DFBETA	$2/\text{raiz}(n)$	0,52

Tabela 11: Critério

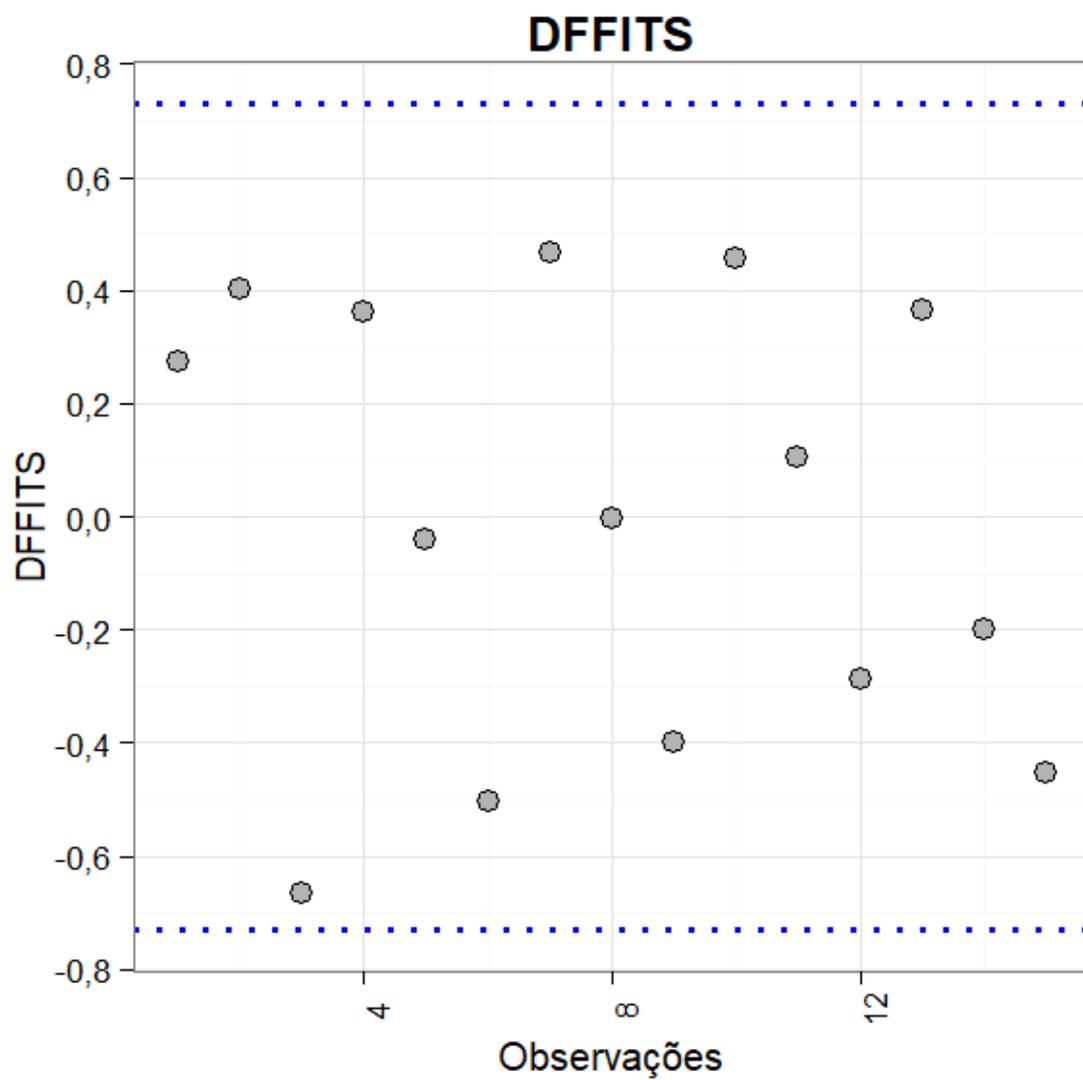


Figura 5: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

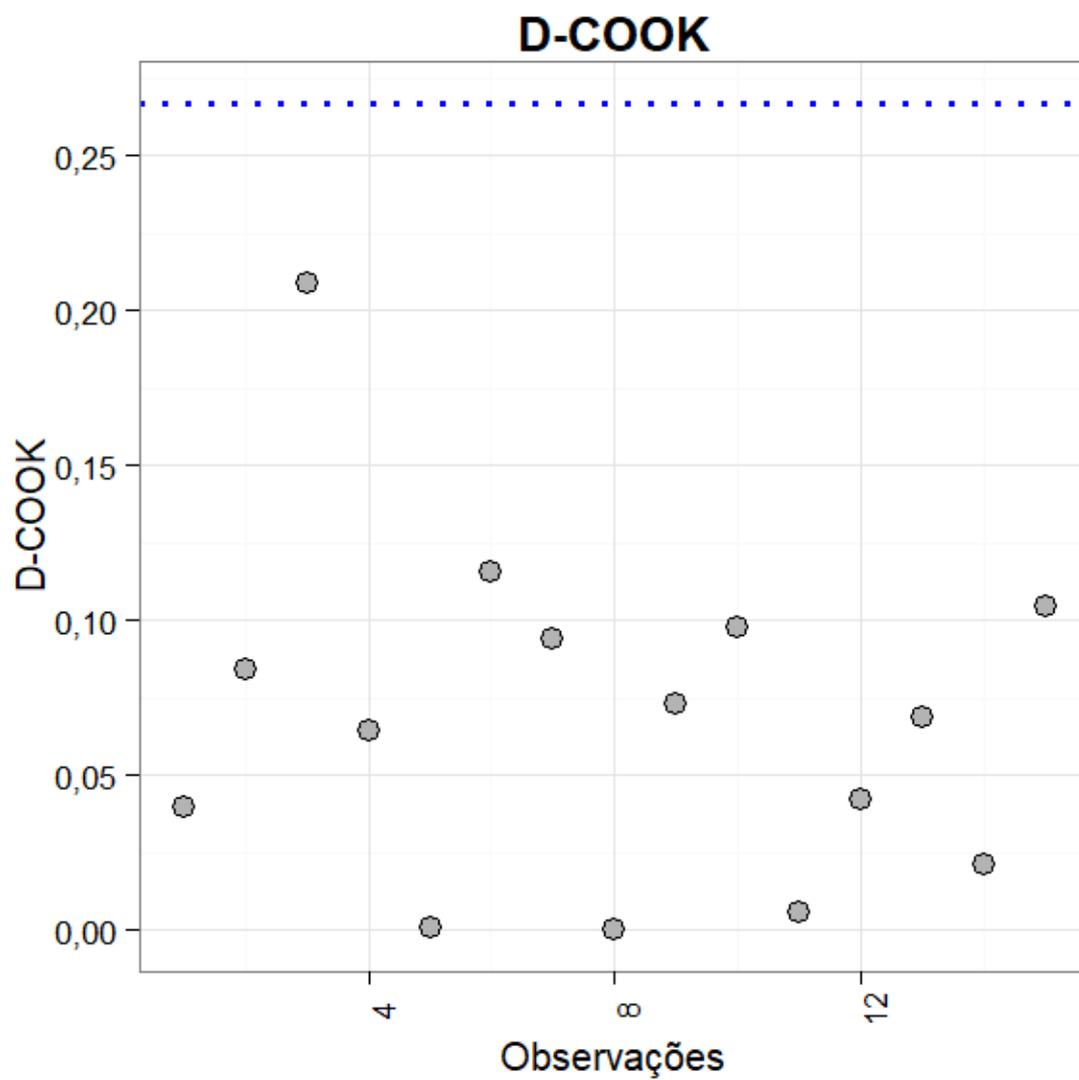
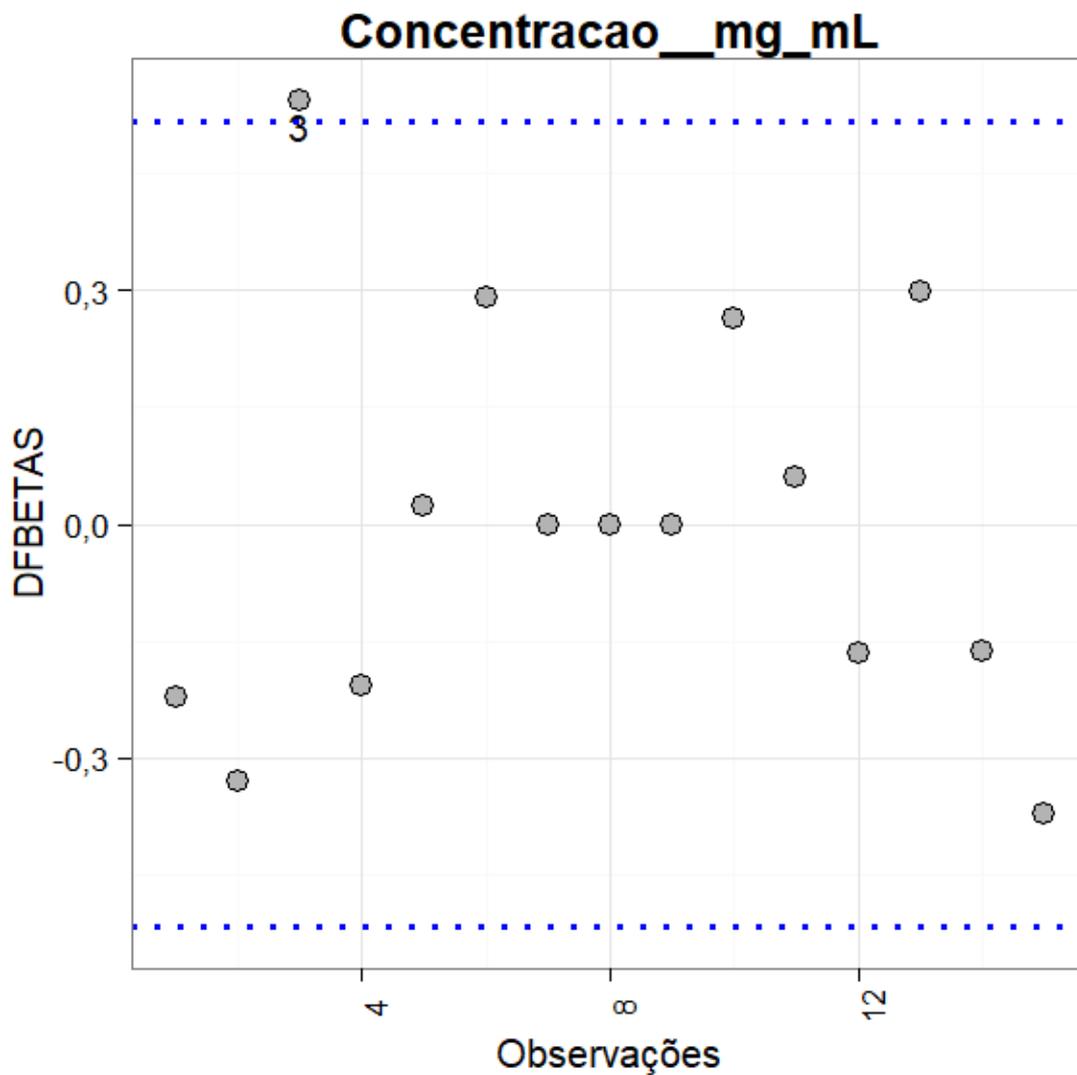


Figura 6: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).



Observações	DFBETA	Critério
3	0,543	0,5164

Tabela 12: Pontos Influentes (DFBETA).

TESTE DE INDEPENDÊNCIA

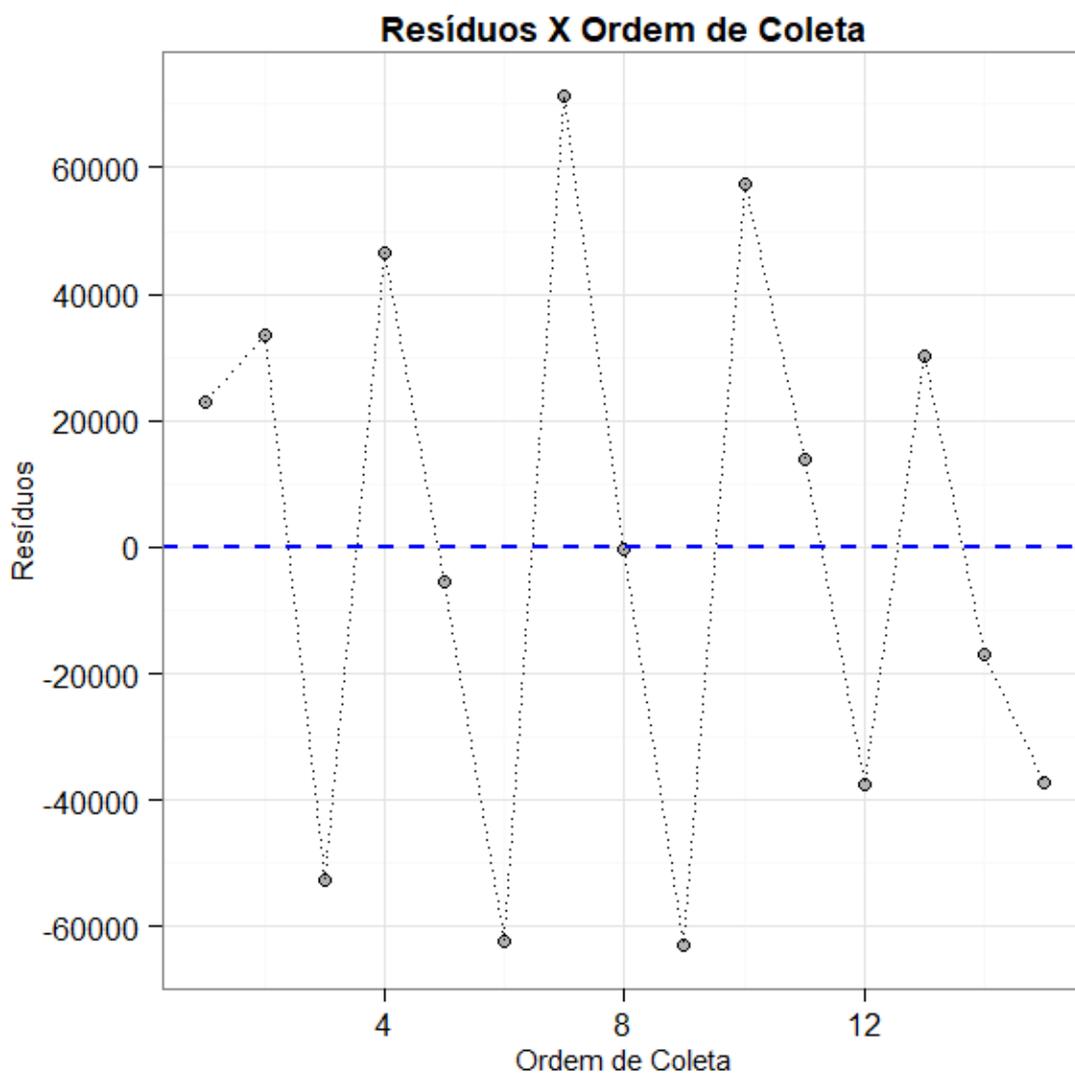
Neste item testamos a independência das observações através do seguinte teste de hipóteses:

H0: Observações são independentes;

H1: Observações não são independentes.

Estatística	P-valor
2,829	0,1487

Tabela 13: Teste de Independência - Durbin-Watson



Como P-valor (0,1487) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05. Logo, não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

RESUMO DO ESTUDO DE LINEARIDADE

Para finalizarmos, apresentamos uma tabela com o resumo do estudo.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9902 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Tabela 14: Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).