

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE DIMETICONA EM SIMETICONA POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

CLÁUDIA FLAVIANA DA SILVA ACUNHA

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, agosto de 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Cláudia Flaviana da Silva Acunha

**Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de
dimeticona em simeticona por cromatografia gasosa**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Química

Prof. Dr. Orientador João Henrique Z. dos
Santos

Porto Alegre, agosto de 2008.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre maio de 2006 e agosto de 2008, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Orientador João Henrique Zimnhoc dos Santos. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Maria do Carmo
Ruaro Peralba

Prof^a. Dra. Clarice Maria
Sartori Piatnicki

Prof^a. Dra. Carin von Mühlen

Prof. Dr. Orientador Joao
Henrique Zimnoch dos Santos

Mestranda Claudia Flaviana
da Silva Acunha

*É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.
Friederico Nietzsche*

Agradecimentos

Ao meu esposo, amante e amigo fiel, de todas as horas, pela sua compreensão e amor.

Ao professor João Henrique Z. dos Santos pela paciência e confiança em meu trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo auxílio concedido durante a dissertação.

À Kley Hertz S.A. pela disponibilização de seu laboratório de análises.

À Innova S.A. pela disponibilização de seu laboratório de análises.

Aos professores da comissão examinadora por aceitarem participar de minha avaliação.

Aos professores, Maria do Carmo Ruaro Peralba e Cesar Liberato Petzhold por terem cedido seus laboratórios para estudos de qualificação.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pela confiança e carinho.

Às minhas irmãs e irmão pela companhia fiel de todos os domingos.

Aos meus amigos, pela presença constante em minha vida.

Às amigas, Fernanda Contieri Abad e Helena Sofia Hoffmann, pela ajuda e incentivo.

Aos professores da pós-graduação da química pela dedicação.

Aos meus colegas de trabalho, pela amizade, carinho e auxílio durante meu trabalho de mestrado.

SUMÁRIO

	PÁG.
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Silicones	7
3.1.1 Matéria-Prima: Propriedades e Aplicações	9
3.2 Técnicas de Análises	10
3.2.1 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)	10
3.2.2 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	12
3.2.3 Cromatografia	14
3.3 Validação de Métodos Analíticos	15
3.3.1 Parâmetros de Validação	17
3.3.1.1 Especificidade e Seletividade	18
3.3.1.2 Linearidade	18
3.3.1.3 Intervalo ou Faixa de Trabalho	19
3.3.1.4 Limite de Detecção	19
3.3.1.5 Limite de Quantificação	20
3.3.1.6 Precisão	21
3.3.1.7 Exatidão	22

3.3.1.8	Robustez	24
3.3.2	Critérios de Aceitação	25
3.3.3	Documentação de Validação Analítica	25
3.3.3.1	Protocolo de Validação de Metodologia Analítica	26
3.3.3.2	Procedimento Operacional Padrão	26
3.3.3.3	Relatório de Validação de Metodologia Analítica	27
3.3.4	Revalidação	28
4	METODOLOGIA ANALÍTICA	29
4.1	Caracterização da Matéria-prima	30
4.1.1	Reagentes Utilizados	30
4.1.2	Equipamentos	30
4.1.3	Procedimentos de Análises	31
4.1.3.1	Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)	31
4.1.3.2	Espectrometria de Massa	32
4.1.3.3	Cromatografia de Permeação de Gel (GPC)	32
4.2	Método Quantitativo	32
4.2.1	Reagentes Utilizados	32
4.2.2	Equipamentos	33
4.2.3	Preparação das Amostras	33
4.2.3.1	Padrão e Amostra de Simeticona Emulsão 30%	33
4.2.3.2	Padrão e Amostra de Simeticona 100%	34
4.2.4	Parâmetros de Análise	34
4.2.4.1	Análise de Cromatografia Gasosa com Detecção de Ionização de Chama (GC-FID)	34
4.2.4.2	Análise de Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	35
4.2.5	Expressão de resultados	35
4.3	Estratégia de Validação de Metodologia Analítica	36
4.3.1	Especificidade/Seletividade	36
4.3.2	Linearidade e Intervalo	36
4.3.3	Exatidão	37
4.3.4	Precisão	37

4.3.5	Robustez	37
4.3.6	Critérios de Aceitação	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Caracterização da Matéria-prima de Simeticona	41
5.1.1	Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)	41
5.1.2	Espectrometria de Massa	44
5.1.3	Cromatografia de Permeação de Gel	45
5.2	Padronização do Padrão de Dimeticona	46
5.3	Validação de Metodologia Analítica	47
5.3.1	Simeticona emulsão 30%	47
5.3.1.1	Especificidade/Seletividade	47
5.3.1.2	Linearidade e Intervalo	50
5.3.1.3	Exatidão	55
5.3.1.4	Precisão	56
5.3.1.4.1	Precisão Intermediária.....	56
5.3.1.4.2	Repetibilidade.....	57
5.3.1.5	Robustez	59
5.3.1.6	Comparação entre Método Cromatográfico e Espectrométrico	62
5.3.2	Simeticona 100%	63
5.3.2.1	Especificidade/Seletividade	63
5.3.2.2	Linearidade e Intervalo	65
5.3.2.3	Exatidão	69
5.3.2.4	Precisão	70
5.3.2.4.1	Precisão Intermediária	70
5.3.2.4.2	Repetibilidade	70
5.3.2.5	Robustez	72
5.3.2.6	Comparação entre Método Cromatográfico e Espectrométrico	75
5.4	Análise de Amostras Reais	75
6	CONCLUSÃO	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXOS	86

Anexo 1: Tabela de Cochran (alfa=0,01)	87
Anexo 2: Tabela de Cochran (alfa=0,05)	88
Anexo 3: Tabela de Grubbs	89
Anexo 4: Tabela Teste F	90
Anexo 5: Continuação Tabela Teste F	91
Anexo 6: Tabela t-Student	92
Anexo 7: Tabela Qui-quadrado	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de inversão da ligação siloxana.	7
Figura 2. Representação da molécula de polidimetilsiloxano.	8
Figura 3. Regiões de absorção das ligações no infravermelho próximo. Adaptado da referência.	11
Figura 4. Espectros utilizados na construção da biblioteca de simeticona no espectroscópio de infravermelho próximo.	41
Figura 5. Espectros utilizados na construção da biblioteca de simeticona no espectroscópio de infravermelho próximo aplicado a segunda derivada.	42
Figura 6. Espectro de uma amostra de simeticona Emulsão 30% MP no NIRS.	42
Figura 7. Espectro de uma amostra de simeticona Emulsão 30% MP aplicada à segunda derivada.	43
Figura 8. Espectro de massa do primeiro pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona.	44
Figura 9. Espectro de massa do segundo pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona..	44
Figura 10. Espectro de massa do terceiro pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona.	45
Figura 11. Cromatograma do padrão USP de polidimetilsiloxano por cromatografia de permeação de gel.	45
Figura 12. Cromatograma da amostra de simeticona emulsão 30% por cromatografia de permeação de gel.	46

Figura 13.	Cromatograma da amostra de simeticona 100% por cromatografia de permeação de gel.	46
Figura 14.	Cromatogramas das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por cromatografia gasosa para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%.	48
Figura 15.	Cromatogramas das triplicatas da amostra Branco (tolueno) por cromatografia gasosa para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%.	48
Figura 16.	Espectros das triplicatas do padrão de referência de dimeticona do método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%.	49
Figura 17.	Expansão da região de absorção utilizada no método de quantificação de dimeticona por infravermelho.	49
Figura 18.	Espectros das triplicatas da amostra Branco (tolueno) do método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%	50
Figura 19.	Variação da área em função da concentração de dimeticona: A) cromatografia gasosa B) espectroscopia no infravermelho.	51
Figura 20.	Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%, construído pelo software Minitab 2007 ⁶² .	60
Figura 21.	Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%, construído pelo software Minitab 2007 ⁶² .	61
Figura 22.	Cromatogramas das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por cromatografia gasosa para matéria-prima de simeticona 100%.	63

Figura 23.	Cromatogramas das triplicatas da amostra Branco (hexano) por cromatografia gasosa para a matéria-prima de Simeticona 100%.	64
Figura 24.	Espectros das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona 100%.	64
Figura 25.	Espectros das triplicatas da amostra Branco (hexano) por método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona 100%.	65
Figura 26.	Curvas de linearidade do método de quantificação de dimeticona em simeticona 100%: A) cromatografia gasosa B) espectroscopia no infravermelho.	66
Figura 27.	Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona 100%, construído pelo software Minitab 2007 ⁶² .	73
Figura 28.	Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método de espectroscopia no infravermelho para quantificação de dimeticona em simeticona 100%, construído pelo software Minitab 2007 ⁶² .	74

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela I	Classificação de testes analíticos, segundo sua finalidade.	16
Tabela II	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.	16
Tabela III	Limites de Intervalo utilizados na validação de metodologia analítica.	19
Tabela IV	Matriz dos fatores para determinação da robustez do método.	24
Tabela V	Elementos que devem constar no protocolo de validação de métodos.	26
Tabela VI	Elementos que devem constar no procedimento operacional padrão.	27
Tabela VII	Elementos que podem constar no relatório de validação de metodologia analítica.	28
Tabela VIII	Condições cromatográficas da análise de simeticona emulsão 30% e simeticona 100%.	34
Tabela IX	Condições espectroscópicas da análise de simeticona emulsão 30% e simeticona 100%.	35
Tabela X	Níveis de concentração de padrões de dimeticona.	36
Tabela XI	Testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% por cromatografia gasosa.	38
Tabela XII	Testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100% por cromatografia gasosa.	38

Tabela XIII	Parâmetro de validação X Critério de aceitação.	39
Tabela XIV	Resultados de identificação das matérias-primas de simeticona por NIRS.	43
Tabela XV	Linearidade e Intervalo dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	50
Tabela XVI	Resumo de resultados da regressão linear dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	52
Tabela XVII	Resumo de resultados da ANOVA dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	52
Tabela XVIII	Resumo de resultados do teste de Grubbs dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	53
Tabela XIX	Resumo de resultados do teste Bartlett dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	53
Tabela XX	Resumo de resultados do teste Cochran dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	54
Tabela XXI	Resumo da Exatidão e Precisão Intermediária dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	56
Tabela XXII	Resumo dos resultados do parâmetro de repetibilidade dos métodos de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30%.	58
Tabela XXIII	Resultados dos testes de recuperações do analito adicionado para a robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de Simeticona emulsão por cromatografia gasosa.	59
Tabela XXIV	Resultados dos efeitos do teste de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de Simeticona emulsão 30% por cromatografia gasosa.	60

Tabela XXV	Fatores testados na robustez do método de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	61
Tabela XXVI	Resultados dos testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em Simeticona emulsão por espectrofotometria no infravermelho.	62
Tabela XXVII	Linearidade e Intervalo dos métodos de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100%.	65
Tabela XXVIII	Resumo de resultados da regressão linear dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	66
Tabela XXIX	Resumo de resultados da ANOVA dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	67
Tabela XXX	Resumo de resultados do teste de Grubbs dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	67
Tabela XXXI	Resumo de resultados do teste Bartlett dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	68
Tabela XXXII	Resumo de resultados do teste Cochran dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.	68
Tabela XXXIII	Resumo da Exatidão e Precisão Intermediária dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	69
Tabela XXXIV	Repetibilidade do método de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	71
Tabela XXXV	Resultados dos testes de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.	72
Tabela XXXVI	Resultados dos efeitos do teste de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de Simeticona 100% por cromatografia gasosa.	73

Tabela XXXVII	Fatores testados na robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100%.	74
Tabela XXXVIII	Resultados dos testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100% por espectrofotometria de infravermelho.	74
Tabela XXXIX	Resultados de amostras analisadas com os métodos validados de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama.	76

ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO

v	Graus de liberdade
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Química Analítica Oficial (Association of Official Analytical Chemists)
BP	Farmacopéia Britânica (British Pharmacopeia)
DMCT	Telereto de cádmio e mercúrio
DP	Desvio-padrão
DPR	Desvio-padrão relativo
DTGS	Sulfato de triglicina
ELSD	Detector evaporativo de espalhamento de luz (evaporative light scattering detector)
FDA-US	Administração de alimentos e medicamentos (Food and Drugs Administration – United States)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (Gas-chromatography-flame-ionization-detector)
GPC	Cromatografia de Permeação de Gel (gel-permeation chromatography)
HP	Marca do fornecedor (Hewlett-Packard)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation)
ICP-OES	Espectrometria de emissão de plasma indutivamente acoplado (inductively coupled plasma spectrometer)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização, e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MP	Matéria-prima

MQ	Média quadrática
NIRS	Espectroscopia de infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy)
NMR	Ressonância magnética nuclear (nuclear magnética ressonance)
PDMS	Polidimetilsiloxano
POP	Procedimento Operacional Padrão
PPGQ	Programa de pós-graduação em química
R ²	Coefficiente de correlação linear
Retém	Local onde se guardam as amostras de contra-prova das matérias-primas analisadas.
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho (size-exclusion chromatography)
SQ	Soma dos quadrados
u.a.	Unidade de área
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USP	Farmacopéia americana (United States Pharmacopeia)
UV	Espectrofotometria de ultravioleta
V	Variância
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

RESUMO

O presente trabalho versa sobre o desenvolvimento de dois métodos quantitativos para determinação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama. Essas matérias-prima são utilizadas em várias áreas, na farmacêutica podem ser empregadas como princípios ativos em medicamentos, como agente diminuidor de bolhas no trato gastrointestinal. Para garantir que os métodos de cromatografia gasosa, de fato, eram para a finalidade para a qual foram desenvolvidos, foi utilizado o processo de validação de metodologia analítica, baseado na resolução 899 da ANVISA. Para melhor acompanhamento foi realizada, concomitantemente, a validação do método farmacopeico para quantificação de dimeticona em simeticona emulsão, encontrado na farmacopéia americana USP 29, 2006 pela técnica de espectroscopia de absorção molecular no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O parâmetro de linearidade apresentou coeficiente de correlação acima de 0,99 para os quatro métodos validados, os teores de recuperação do analito para os parâmetros de exatidão, precisão e robustez ficaram entre 93% e 107%. Os desvios-padrão relativos calculados para as figuras de mérito de exatidão, precisão e robustez foram inferiores a 5%. Esses resultados indicam que todos os métodos estudados podem ser utilizados de acordo com os critérios de aceitação estipulados. Para aumentar a confiabilidade dos métodos cromatográficos e espectroscópico fez-se uso de alguns testes estatísticos como: teste de validade da regressão, análise de variâncias e teste para dados discrepantes no parâmetro de linearidade; teste t-Student para exatidão e precisão; e planejamento fatorial para o teste de robustez, calculando-se a significância dos efeitos dos fatores. Por fim, analisaram-se algumas amostras de matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100%, para teste em amostras reais, obtendo-se valores entre 90 e 102% (m/m) de dimeticona em matéria-prima de simeticona.

ABSTRACT

The aim of the present research was the development of two quantitative methods for dimethicone determination in simethicone emulsion 30% and simethicone 100% raw material by gas chromatography with flame ionization detector. These raw materials are used in the manufacture of several pharmaceuticals such as an active ingredient to inhibit flatulence due to excess of gastrointestinal gas. In order to guarantee that the developed methods were suitable for the purpose, an analytical process validation based on the resolution no. 899 from ANVISA was carried on. The concomitant evaluation was performed taking into account the pharmacopeia method validation grounded on simethicone monograph (USP 29, 2006) by Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR). The validation parameters of linearity presented correlation coefficient of 0.99 for all four validated methods. The values of the analyte recovery in terms of precision, accuracy and robustness lain between 93% and 107%. The relative standard deviation for the figures of merit validation was below 5%. The results demonstrated that all tested methods can be used to the purpose they were intended, according to the established acceptance criteria. To increase the chromatography and spectroscopic method confiability, some statistical tests were used, such as: regression validation, analysis of variance and outliers test to linearity; t-Student test to accuracy and precision, factorial experiment design to robustness. Finally, some real samples raw materials were analyzed and the results lain between 90 and 102% (w/w) of dimethicone in simethicone raw material.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A química analítica, atualmente, tem contado muito com o avanço tecnológico para o desenvolvimento de novas metodologias. Para se quantificar determinada substância, nos dias de hoje, tem-se no mínimo duas técnicas analíticas que podem ser utilizadas, contudo, qual a melhor? Na realidade, a decisão vai depender de cada laboratório, e esse deve buscar a melhor combinação possível entre alguns fatores, como: disponibilidade de equipamento, facilidade de interpretação de dados, e estado físico da amostra, sem descuidar de uma série de procedimentos que garantam que a metodologia seja válida para a sua finalidade.

A indústria farmacêutica faz uso da validação de metodologia para garantir que a quantidade de princípio ativo presente em seus medicamentos esteja dentro do limite permitido, principalmente, por ela lidar com uma área que afeta diretamente a vida do ser humano. Dentre eles, a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% é de fundamental importância dentro da área farmacêutica, já que essa utiliza esses produtos como princípio ativo em algumas formulações. Normalmente, o ensaio de quantificação é realizado por espectroscopia molecular no infravermelho, conforme metodologia descrita na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP)¹. Contudo algumas empresas não possuem o equipamento em questão para essa análise, e buscam alternativas válidas para essa determinação, em função da disponibilidade de instrumentos.

A finalidade desse trabalho, então, foi buscar uma alternativa confiável para determinação de dimeticona em matéria-prima de simeticona, com os instrumentos disponíveis, além da técnica de espectroscopia molecular no infravermelho, utilizando-a para comprovar que a cromatografia gasosa também possa gerar resultados confiáveis. Para garantir essas análises quantitativas, utilizou-se da validação de metodologia analítica. Considerando o analito em estudo, a dimeticona, enquadrada na categoria I, de princípio ativo usado em uma formulação farmacêutica, os parâmetros de validação que foram utilizados são os seguintes ²⁵:

- Especificidade/seletividade
- Linearidade;

- Intervalo;
- Precisão: repetibilidade e intermediária;
- Exatidão;
- Robustez.

Assim, a presente dissertação encontra-se disposta da forma descrita a seguir:

O capítulo de revisão bibliográfica primeiramente aborda os silicones em geral e depois discursa sobre os dois tipos de matéria-prima de simeticona utilizadas para a fabricação de formas farmacêuticas, sendo uma em forma de suspensão e outra em forma de cápsulas. Além disso, assuntos pertinentes a esse estudo, a saber, as técnicas utilizadas atualmente para sua qualificação e quantificação, assim como o processo de validação de metodologia analítica são também incluídos nesse capítulo.

O capítulo de metodologia analítica descreve o procedimento analítico empregado para preparação do padrão e da amostra para os métodos de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e de espectroscopia de absorção molecular no infravermelho. Apresenta ainda as condições de análise de cada equipamento utilizado e a estratégia usada para a validação de metodologia analítica.

No capítulo dos resultados e discussão são apresentados os valores encontrados para cada parâmetro de validação, avaliando-se o resultado pelos critérios de aceitação estipulados. Para o parâmetro de linearidade se utilizou o teste estatístico de análise de validade da regressão, os testes de Cochran e Bartlett para análise de homogeneidade das variâncias e o teste de Grubbs para detectar pontos discrepantes. Para a exatidão e precisão foram utilizados o cálculo de desvio-padrão relativo e teste t-Student e para a robustez dos métodos foi empregado o plano de Youden, sendo calculados os efeitos de variação dos fatores e desvio-padrão relativo entre os valores encontrados de teor de recuperação do analito.

Finalmente, o último capítulo trata das principais conclusões extraídas do processo de desenvolvimento do método quantitativo de dimeticona em simeticona (matéria-prima) por cromatografia gasosa, não normalizado, e por espectroscopia molecular no infravermelho, validado pela farmacopéia americana.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a viabilidade de desenvolvimento de uma metodologia analítica quantitativa para determinação de dimeticona em simeticona emulsão 30% e simeticona 100% por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito de condições cromatográficas nas figuras de mérito do método.
- Validar metodologia analítica desenvolvida de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID).
- Validar metodologia analítica de referência de espectroscopia molecular no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Correlacionar os métodos de cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama com o método de espectroscopia molecular no infravermelho por transformada de Fourier.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Silicones

Silicones são polímeros sintéticos contendo um esqueleto de ligações siloxanas (Si-O-Si). Dependendo da estrutura desse esqueleto, óleos silicones, elastômeros ou resinas podem ser obtidos. Graças ao conjunto de suas propriedades, sua aplicação encontra-se em um grande número de processos tecnológicos. Suas vantagens incluem estabilidade térmica elevada, resistência à corrosão, coeficiente térmico de viscosidade baixo, propriedades dielétricas favoráveis, supressor de espumação, ação combinada de hidrofobicidade com natureza inócua fisiológica (aplicação em cirurgia plástica e drogas para flatulência).²

As propriedades peculiares dos materiais de silicone são decorrentes na natureza da ligação siloxana (Si-O-Si). A alta flexibilidade das cadeias (-Me₂SiO-)_n sugere baixa energia rotacional para mudanças de conformação: 7 kJ/mol para o caso de Si, em comparação ao C (18 kJ/mol). A flexibilidade desses materiais também é garantida por uma baixa energia vibracional de deformação angular (Figura-1):

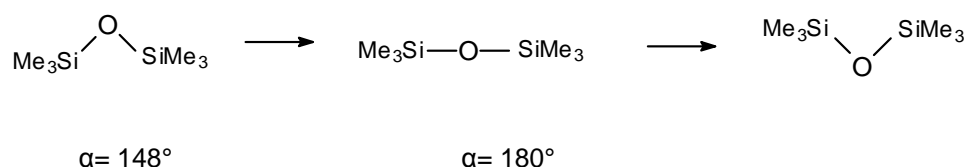


Figura-1. Esquema de inversão da ligação siloxana

A energia potencial para deformação angular restringe sua vibração entre uma faixa de $140^\circ < \alpha < 220^\circ$, onde a transição linear de inversão ($\alpha = 180^\circ$) encontra-se situada apenas a 1 kJ/mol acima do estado fundamental. Isso pode ser conseqüência do fato que na disposição linear Si-O-Si, a ligação O=Si ($p_\pi-d_\pi$) é máxima.

O baixo coeficiente térmico de viscosidade, que garante sua aplicação como óleo lubrificante para faixas extremas de temperaturas, é provavelmente decorrente de dois efeitos antagônicos: cadeias de siloxanas tendem a formar hélices, que são estabilizadas por interações intramoleculares dos segmentos polares Si-O. Em

temperaturas elevadas, as hélices abrem-se e, a dependência convencional da temperatura com a viscosidade³ é compensada pelo aumento das interações intermoleculares das cadeias polisiloxano desdobradas. Efeitos interfaciais de silicones, que lhes conferem importantes aplicações tecnológicas, são baseados na polaridade da ponte Si-O-Si e da natureza hidrofóbica das cadeias alquilas ligadas ao átomo de silício.

Dentre os silicones, cabe aqui destacar o poldimetilsiloxano (PDMS) (Figura-2). As ligações dos grupos metilas com o grupo Si-O dão ao grupo algumas características únicas devido às interações intermoleculares dos grupos metil, que são muito fracas, conferindo ao composto baixa viscosidade, baixa tensão superficial ou baixa permeabilidade².

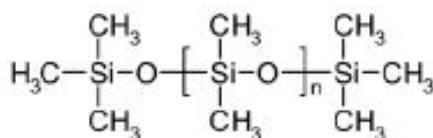


Figura-2: Representação molécula de poldimetilsiloxano

Os silicones são a única classe de polímeros que tem na estrutura parte orgânica e parte inorgânica e, por esse motivo, têm sido extensivamente comercializados, encontrando larga utilização nas indústrias farmacêutica, têxteis e de tintas, por exemplo. Historicamente, essa família de compostos era utilizada em sistemas não aquosos, mas mais recentemente suas aplicações têm abrangido também os sistemas aquosos⁴. A maioria dos compostos de silicones é insolúvel em água, e devido a esse fato, são colocados em sistemas de emulsão. Emulsões são sistemas heterogêneos consistindo de um líquido imiscível disperso em outro na forma de gotas que tem instabilidade termodinâmica⁵.

Na área farmacêutica, os silicones podem ser usados tanto como excipiente, como princípio ativo. Como excipiente, pode ser usado como fluído em produtos tópicos, como adesivo em produtos *patches* transdérmicos, como lubrificante de agulhas de seringas, ou ainda como elastômeros de tubos para a transferência de

remédios. Como princípio ativo é utilizado como antiflatulante, blenda de PDMS com sílica, conhecido pela Farmacopéia como simeticona, sendo essa uma blenda de dimeticona e sílica.

A Farmacopéia Britânica (BP), Americana (USP) e Portuguesa contêm monografia da simeticona, enquanto que a Japonesa e brasileira não possuem essa monografia.

3.1.1 Matéria-prima: Propriedades e Aplicações

Encontra-se no mercado uma boa variedade de matéria-prima de simeticona, neste trabalho foram abordados dois tipos: simeticona 100% e simeticona emulsão 30%, nomes comerciais Dow Corning Medical Antifoam A Compound e Dow Corning Medical Antifoam C Emulsion, respectivamente, fabricados pela empresa Dow Corning do Brasil Ltda (Campinas, Brasil).

A simeticona 100% é composta de 94 a 96 % de dimeticona, também podendo ser conhecida como polidimetilsiloxano, e de 4 a 4,5% de sílica. É um produto usado como supressor de bolhas, pois diminui a tensão superficial da maior parte dos sistemas. É utilizada como princípio ativo em fórmulas farmacêuticas contra flatulência, dor de estômago e azia. Pode ser usada, também no auxílio de diagnóstico em gastroscopia e radiografia do intestino. Sua aparência é um líquido translúcido viscoso, sendo sua viscosidade de 1100 cSt, gravidade específica de 0,97 e índice de refração 1,402, a 25°C. Essa matéria-prima é praticamente insolúvel em água e metanol, miscível em éter, acetato de etila, metil-etil-cetona e tolueno, muito pouco solúvel em etanol. Trata-se de uma substância não tóxica que é expelida pelas fezes sem metabolização. No caso de existir a presença de octametilciclotetrasiloxano, deve-se evitar contato com a pele, olhos e respiração, pois essa substância, em estudos com ratos causou pequena alteração no fígado. Sua dose diária não deve exceder 500mg, sendo que sua superdosagem deve ser acompanhada por um médico; gestantes não devem utilizar medicação contendo simeticona⁷.

A simeticona emulsão 30% é uma matéria-prima emulsionada com água, contendo aproximadamente 30% de simeticona 100%, sua aparência é de um líquido branco viscoso, sendo sua viscosidade próxima de 500 cSt e a gravidade

específica a 25°C é um. Assim como a simeticona 100%, a simeticona emulsão 30% também é utilizada como princípio ativo em fórmulas farmacêuticas, como agente supressor de gases no estômago e intestino, eliminando desconfortos e dores⁷.

Essas matérias-primas podem também ser utilizadas na forma tópica, em cremes, loções pós-barba, xampus, condicionadores, produtos para tratamento de cutículas, etc⁷.

3.2 Técnicas de Análises

3.2.1 Espectroscopia de absorção molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)

Como já abordado na introdução, a técnica utilizada pela farmacopéia americana (USP) é a espectroscopia no infravermelho. Escolheu-se, então, a técnica de espectroscopia molecular no infravermelho próximo para caracterizar a matéria-prima de simeticona, em função da disponibilidade do equipamento e pela facilidade de análise, sendo que é uma técnica não destrutiva e sem necessidade de pré-tratamento.

A técnica de NIRS é altamente eficiente tanto para análises qualitativas como quantitativas. A região espectral que esse método compreende é a faixa do espectro eletromagnético entre 700 e 2500 nm, onde as amostras apresentam absorvância com muito menor intensidade do que na região do infravermelho médio⁸. As bandas de absorção nessa região são harmônicas ou combinações de bandas de estiramento fundamentais que ocorrem na região de 3000 a 1700 cm^{-1} .

As bandas de absorção de NIRS são largas, com largura de banda de 50 a 100 nm. Por essa razão pode haver muita sobreposição de bandas, tornando a interpretação do espectro bastante complexa. Foi necessário, então, que houvesse um grande melhoramento nos equipamentos de NIRS e um bom avanço nos tratamentos quimiométricos, utilizando análise multivariada e algoritmos nas análises qualitativas e quantitativas, para garantir confiabilidade à técnica. A Figura 3 mostra os grupos funcionais passíveis de absorver na região do infravermelho próximo.

Os componentes e o delineamento do instrumento de espectrofotometria de infravermelho próximo são similares aos de absorção molecular no ultravioleta e visível, sendo a fonte de luz normalmente uma lâmpada de tungstênio/halogênio e um detector de sulfeto de chumbo. Os valores de caminhos ópticos podem variar de 0,1 a 10 cm⁹.

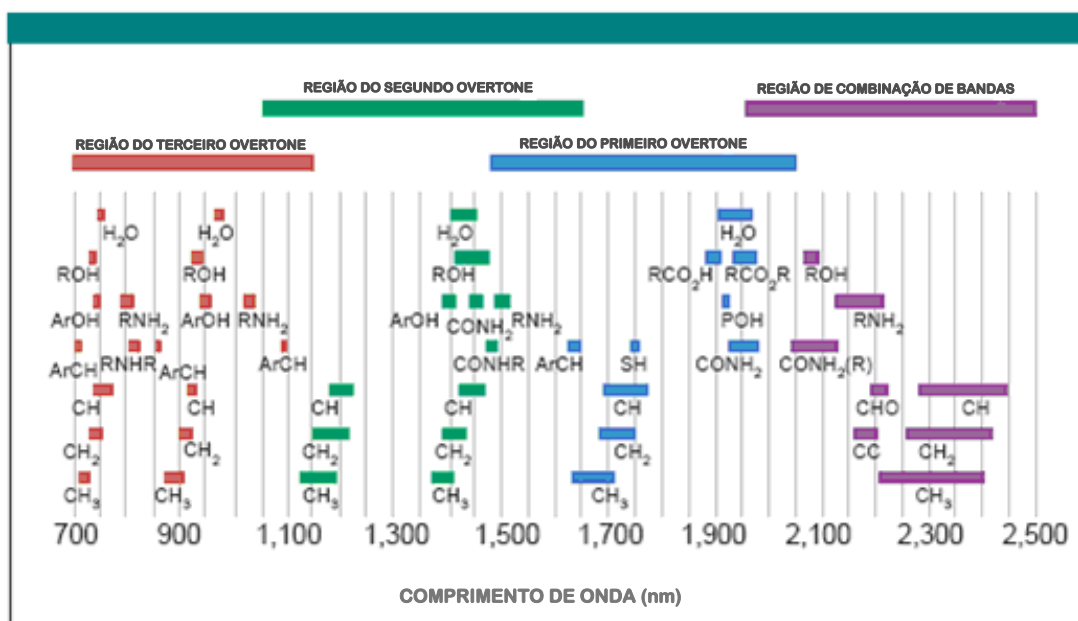


Figura 3. Grupos funcionais que absorvem na região do espectro molecular no infravermelho próximo. Adaptado da referência ¹⁰.

Para se desenvolver e validar um método por infravermelho próximo é necessário passar por algumas etapas:¹¹

- Teste de identificação;
- Teste de qualificação;
- Procedimento de quantificação.

O teste de identificação é efetuado para garantir que o analito em análise seja efetivamente aquele definido no escopo do método, principalmente quando esse é analisado em uma matriz complexa. Isso normalmente é realizado comparando o espectro da amostra, com transformações matemáticas/quimiométricas, com uma biblioteca de referência formada por amostras previamente selecionadas e que sejam representativas para a finalidade do método.

O teste de qualificação é realizado para garantir e confirmar o tipo de matéria-prima que se está analisando, principalmente quando, em testes simples de identificação dos materiais, os resultados apresentam-se indistinguíveis. A qualificação é um pré-requisito obrigatório para o teste de quantificação de NIRS, pois essa etapa assegura que o material pertence à população correta.

O procedimento de quantificação é usado para medir a concentração do analito em determinada amostra. Pode-se medir, na área farmacêutica, o componente majoritário, uma impureza, material inapropriado (ex. água) presentes em substâncias ativas ou em intermediários sintéticos¹¹.

3.2.2 Espectroscopia de absorção molecular no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A região, do infravermelho, mais utilizada é a faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , sendo de grande utilidade na química orgânica para a identificação de estruturas de moléculas. As ligações químicas dos compostos possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem aos níveis de energia da molécula. A radiação infravermelha quando absorvida converte-se em energia de vibração molecular, que pode ser detectada por um sensor capaz de transformar a energia radiante incidente em sinal mensurável, geralmente elétrico. O espectro infravermelho obtido fornece bandas características de determinados grupos funcionais, que permite obter informações sobre a molécula em estudo.¹²

O processo instrumental de análise precisa dos seguintes componentes:

- Fonte: energia infravermelha emitida usualmente por um globo (bastão de carvão de silício) que alcança altas temperaturas entre 1000 e 1800°C;
- Interferômetro: preserva a informação de frequência e intensidade, constituído de um divisor de feixes, um espelho fixo e um espelho móvel;
- Amostra: a energia infravermelha interage com amostra, sendo nessa etapa, que frequências específicas, da estrutura molecular, são absorvidas;
- Detector: detecta o que passou de energia, resultando num interferograma resultante do registro do sinal do detector como função da diferença de caminho ótico entre os dois feixes do interferômetro. Os mais utilizados são do sulfato de

triglicina (DTGS) e o de telureto de cádmio e mercúrio (DMCT);

▪Processador: atualmente, um computador, que de fato, aplica o processo matemático de transformada de Fourier ao interferograma obtido da amostra, gerando um espectro que possa ser interpretado e processado¹³.

Podem-se obter espectros de infravermelho de compostos sólidos, líquidos e gasosos, sendo que, para cada estado, tem-se uma técnica de preparação de amostra, as mais comuns são:

▪Gases: expande-se a amostra em célula cilíndrica, previamente evacuada, e de janelas apropriadas, de caminho ótico que varia de alguns centímetros até 40 metros;

▪Líquidos: podem ser analisados puros ou em solução, cuidando para não se utilizar um solvente que possa atrapalhar a região de absorção do analito em estudo. Normalmente, utilizam-se células com caminhos óticos estreitos entre 0,01 e 1 mm, com janelas de cloreto de sódio, ou cloreto de prata, quando o solvente dissolve o primeiro.

▪Sólidos: em função da dificuldade de se encontrar solventes que não absorvam na região de interesse da maior parte dos compostos sólidos, usualmente se utiliza a dispersão do material em análise, finamente dividido, com brometo de potássio, que sob pressão (10.000 a 15.000 psi), produz um disco transparente, possível de ser posicionado no feixe do instrumento de FTIR.

A espectroscopia de infravermelho vem sendo utilizada desde fins de 1950 para fins qualitativos, que juntamente com a espectroscopia de ressonância magnética revolucionou o modo como os químicos passaram a identificar espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas. Naquela época o infravermelho, usando instrumentação dispersiva, obtinha resultados quantitativos de qualidade inferior aos obtidos com espectroscopia de ultravioleta-visível. Em delineamentos atuais, empregando o tratamento do espectro por Transformada de Fourier, a precisão e a exatidão das medidas melhoraram consideravelmente os resultados. Contudo, uma atenção meticulosa aos detalhes de análise deve ser ainda considerada.⁹

A monografia da matéria-prima de simeticona, contida na farmacopéia americana (USP) apresenta a quantificação de dimeticona por espectroscopia

molecular no infravermelho, em forma de polidimetilsiloxano, e essa técnica será de validade e utilizada para comparação com o método desenvolvido por cromatografia gasosa.

Os compostos de silício, como a dimeticona, possuem vibrações das ligações Si-H de forte intensidade em torno de 2200 cm^{-1} , correspondendo aos estiramentos simétrico e assimétrico. Já as ligações Si-O-Si absorvem por volta de $1098\text{-}1015\text{ cm}^{-1}$, sendo fortes e largas resultantes do estiramento simétrico e assimétrico do grupo Si-O⁶. Nesse estudo, foi utilizado o número de onda de 1260 cm^{-1} , onde ocorre a deformação simétrica das ligações Si-CH₃, banda forte e estreita, conforme indicado pela USP^{1,14}.

3.2.3 Cromatografia

A matéria-prima de simeticona pode tanto ser usada em formulações sólidas, (simeticona USP 100%), quanto em formulações líquidas em suspensão (simeticona emulsão 30%). Em função da simeticona ser um tipo de polímero, sua quantificação é um pouco complexa, e sua análise não tem tido bons desenvolvimentos de metodologia. A detecção por UV não é possível devido à ausência de grupos cromóforos no PDMS [15]. O método apresentado na monografia da USP é uma boa alternativa. Contudo, é necessário um espectrofotômetro de infravermelho ¹.

Atualmente há estudos relatando a quantificação de dimeticona por cromatografia por exclusão (SEC) ou permeação de gel (GPC), usando como detecção o princípio do índice de refração¹⁶, assim como HPLC-ELSD, cromatografia líquida de alta eficiência com detector evaporativo de espalhamento de luz ¹⁵. Existem ainda outros desenvolvimentos envolvendo cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria atômica de emissão com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)¹⁷ e HPLC com ressonância magnética (NMR) acoplado em polidimetilsiloxanos¹⁸. Para caracterização, encontram-se ainda pesquisas na área de espectrometria de massa, usando previamente cromatografia de exclusão para separação ^{19,20,21}.

Nessa dissertação optou-se por trabalhar com cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama^{22,23}, técnica simples e comumente achada em

laboratórios farmacêuticos. Para confirmação dos compostos utilizados na quantificação, utilizou-se cromatografia gasosa com espectrômetro de massa de quadrupolo.

3.3 Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que o método desenvolvido por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama é adequado para a quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30% e simeticona 100% foi utilizado o processo de validação de metodologia analítica.

Segundo a NBR ISO/IEC 17025, 2001²⁴, a validação de um método analítico é a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. A indústria farmacêutica brasileira utiliza atualmente a legislação da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) como referência à validação de metodologia analítica, onde está estabelecido que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos²⁵. A EURACHEM²⁶ traz ainda que a validação de método é o processo de definir uma exigência analítica, e confirmar que o método em consideração apresenta capacidade de desempenho consistente para a aplicação pretendida. Por sua vez, a organização mundial da saúde (WHO) define que validação analítica é a garantia de que o procedimento analítico selecionado dará resultados reprodutíveis e confiáveis para a proposta pretendida²⁷.

A legislação brasileira estipula ainda que a metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, pode ser considerada validada. No caso da inexistência da metodologia analítica nesses compêndios, a ANVISA considera a metodologia validada quando forem avaliados os parâmetros relacionados nas Tabelas I e II.

Tabela I: Classificação de testes analíticos, segundo sua finalidade²⁵.

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Teste de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Teste de identificação.

Tabela II: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade²⁵.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	Ensaio Limite			
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não	
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Caso houver comprovação de reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da Precisão intermediária.

Atualmente existe uma grande variedade de artigos que abordam validação de metodologia analítica, na área farmacêutica. Desenvolvimentos tais como a quantificação de lapachol em solução²⁸, captocril em comprimidos²⁹ e clotrimazol em solução spray³⁰ encontram-se descritos na literatura.

Para validar um método é necessário realizar algumas etapas, tais como:

- Definir da aplicação, objetivo e escopo;

- Definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- Planejar o processo de validação, como busca de referências bibliográficas, seleção de métodos disponíveis e pré-requisitos, como reagentes, vidrarias, padrões de referencia, etc.
- Desenvolver o método que será validado;
- Qualificar os materiais de análise;
- Produzir um procedimento operacional padrão para a validação;
- Realizar os experimentos de validação com pessoal qualificado;
- Documentar a validação de metodologia analítica, gerando os seguintes documentos: protocolo de validação, procedimentos operacional padrão e relatório de validação de metodologia analítica³¹.

3.3.1 Parâmetros de Validação

Os parâmetros de validação devem ser bem definidos de acordo com legislação vigente para analito em estudo. Caso não exista nenhuma em vigor, escolher uma linha de validação para ser executada^{24, 25, 26, 27, 31, 32, 33}.

Dua agências brasileiras, INMETRO e ANVISA, baseadas em normas internacionais de validação de metodologia analítica, utilizam os seguintes termos para os parâmetros de validação, podendo-se observar a diferença de terminologia:

- INMETRO³¹: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ); sensibilidade (inclinação da curva), exatidão e tendência (*bias*), precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), robustez e incerteza de medição.

- ANVISA²⁵: especificidade/seletividade, intervalos da curva de calibração, linearidade ((curva de calibração, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ); exatidão, precisão: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), robustez.

A seguir serão abordadas as definições de cada elemento de validação.

3.3.1.1 Especificidade e Seletividade

A ANVISA traz esse parâmetro num único conceito, que diz que seletividade/especificidade definem a capacidade do método de detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, em que substâncias diferentes podem apresentar respostas semelhantes, deve-se ter o cuidado de se utilizar detectores do tipo fotodiodos ou espectrômetro de massa para confirmar que o pico cromatográfico é atribuído ao analito em estudo²⁵.

O guia de orientação do INMETRO traz separadas as definições: especificidade é utilizada quando um método tem capacidade de produzir resposta para apenas um analito, enquanto que seletividade é usada quando um método produz resposta para vários analitos, mas pode distinguir a resposta de um analito frente aos outros³¹.

3.3.1.2 Linearidade

Linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa específica²⁵. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida (sinal do equipamento) e a concentração do analito. A linearidade é obtida pela padronização interna ou externa e formulada pela equação matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y=ax+b$, onde: y = resposta medida (área do pico); x =concentração; a =inclinação da curva de calibração=sensibilidade; b =intersecção com eixo y , quando $x=0$ ³¹.

Para o parâmetro de linearidade, de acordo com a ANVISA²⁵, USP¹ e ICH³⁴, são necessários no mínimo cinco níveis de concentração de padrões. Por outro lado, para a AOAC³⁵ são utilizados quatro níveis de concentração de padrões, medindo durante três dias.

A avaliação da linearidade pode ser realizada sob diversas formas, utilizando-se cálculos estatísticos de regressão linear, análise de variância, teste t-Student, entre outros^{25, 31, 36, 37, 38, 41}.

3.3.1.3 Intervalo ou Faixa Linear de Trabalho

Intervalo ou faixa linear de trabalho corresponde à faixa do maior ao menor nível de concentração do analito, estipulado a partir do parâmetro de linearidade. De acordo com a ANVISA, os limites percentuais que devem estar contidos na faixa linear para alguns métodos analíticos estão expostos na Tabela III.

Tabela III: Limites de Intervalo utilizados na validação de metodologia analítica ^{1,25, 34}

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste.
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo.

A faixa de trabalho deve cobrir o intervalo de aplicação para a qual o ensaio de quantificação vai ser utilizado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que viável, ficar no centro da faixa linear³¹.

3.3.1.4 Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas²⁵.

Várias metodologias podem ser utilizadas para a determinação do limite de detecção, dependendo se é para técnicas analíticas instrumentais ou não-instrumentais. A seguir serão descritas algumas metodologias aceitas e descritas em guias de validação analítica internacionais e nacionais^{25, 31, 32 33, 34}.

- Baseado na avaliação visual.^{25,32,33,34}

Pode ser usada para métodos instrumentais ou não instrumentais, sendo o limite de detecção determinado pela análise de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito, de forma que fique estabelecido o menor nível de concentração que se possa detectar o analito.

- Baseado no estudo de sinal-ruído.^{32,33,34}

Esse estudo é para procedimentos analíticos que exibem linha de base, sendo determinada a razão sinal-ruído a partir da comparação das medidas de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito com amostras de branco, até que se estabeleça uma relação de 3:1 ou 2:1 de sinal-ruído. Essa concentração mínima é considerada o limite de detecção.

- Baseado no desvio-padrão em parâmetros da curva analítica^{25,31,32,33,34}

O limite de detecção pode ser expresso por:

$$LD = \frac{3,3DPa}{IC} \quad (\text{equação-1})$$

Onde:

LD = limite de detecção;

DPa = desvio padrão do intercepto com eixo y (coeficiente linear) de no mínimo três curvas.

IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular)

3.3.1.5 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 estabelecidas²⁵. Assim como o limite de detecção, o limite quantificação possui três formas de ser determinado.

- Baseado na avaliação visual.^{32,33,34}

Esse método pode ser usado tanto para técnicas instrumentais quanto para

não instrumentais, o limite de quantificação pode geralmente ser determinado pela análise de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito em estudo, de forma que se estabeleça a mínima concentração que possa ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

- Baseado no estudo de sinal-ruído.^{32,33,34}

Essa metodologia de determinação do limite de quantificação pode ser utilizada somente para técnicas que possuam linha de base. A relação sinal-ruído é obtida a partir da comparação das medidas de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz com medidas de amostras do branco, até que se encontre a concentração mínima que ofereça uma razão sinal-ruído de 10:1.

- Baseado no desvio-padrão em parâmetros da curva analítica^{25,31,32,33,34}

O limite de quantificação pode ser expresso por:

$$LQ = \frac{10DPa}{IC} \quad (\text{equação-2})$$

Onde:

LD = limite de detecção;

DPa = desvio padrão do intercepto com eixo y (coeficiente linear) de no mínimo três curvas.

IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular)

3.3.1.6 Precisão

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra²⁵. De acordo com o INMETRO³¹ precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de padrões, em condições definidas.

Esse parâmetro pode ser realizado de três formas diferentes: repetibilidade²⁵ ou repetitividade³¹, reprodutibilidade e precisão intermediária.

▪ Repetibilidade ou repetitividade é grau de concordância entre os resultados de sucessivas medidas de um mesmo mensurando, efetuados dentro de um curto espaço de tempo, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmas condições ambientais e mesmo procedimento padrão^{25,31}. De acordo com os guias da ANVISA, do ICH e da USP, pode-se verificar esse elemento de validação realizando nove medições, sendo três de concentração baixa (50%), três de concentração média (100%) e três de concentração alta (150%), ou ainda seis medições seguidas da concentração próxima ao alvo (100%). O guia do FDA estipula 15 medições: cinco para cada concentração (baixa, média e alta), enquanto que o do INMETRO indica sete ou mais repetições da amostra.

▪ Reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica²⁵. A reprodutibilidade não é usada como parâmetro de validação quando o método é utilizado por um único laboratório, mas somente quando é necessária a verificação de desempenho deste método³¹.

▪ Precisão intermediária é a concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes²⁵. O INMETRO também chama esse termo de reprodutibilidade interna, avaliando a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente as condições a variar, como, por exemplo, analistas, equipamentos e tempo³¹.

A avaliação dessas três formas de precisão pode ser efetuada pelo cálculo do desvio-padrão relativo (DPR) ou do coeficiente de variação (CV), sendo o valor máximo admitido pela ANVISA de 5%.

3.3.1.7 Exatidão

Exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados encontrados em relação ao valor verdadeiro²⁵. Importante observar que o valor verdadeiro é uma medida obtida num processo perfeito, sendo este valor, então impossível de se obter. Então o valor verdadeiro é aquele estimado e convencionalmente aceito como verdadeiro³¹.

A exatidão deve ser estabelecida de acordo com a faixa específica de linearidade para cada metodologia analítica:^{25, 34, 39, 40}

▪ *Quantificação de princípios ativos*: utilizar a metodologia analítica na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência); comparando os resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia analítica bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido definida. A exatidão pode ser inferida, uma vez que a precisão, linearidade e especificidade já tenham sido estabelecidas.

▪ *Quantificação de uma forma farmacêutica*: análise de amostras sintéticas, na qual a quantidade de princípio ativo que foi adicionada a matriz isenta desse (placebo) é conhecida. Em casos em que o placebo da forma farmacêutica não possa ser obtido, aceita-se a adição de padrão, adicionando-se quantidades conhecidas do analito ao medicamento pronto. A exatidão pode ser inferida, uma vez que a precisão, linearidade e especificidade já tenham sido estabelecidas.

▪ *Quantificação de impurezas*: análise pelo método de adição de padrão, no qual se adicionam quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação à forma farmacêutica. Quando as impurezas e/ou produtos de degradação são indisponíveis, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia validada)^{25, 34, 39, 40}.

Os guias do ICH, AOAC, USP e ANVISA indicam a análise de nove amostras, sendo três de concentração baixa, três de concentração média e três de concentração alta. O resultado é expresso em percentual de recuperação da quantidade conhecida de analito adicionado à amostra. A equação-3 pode ser usada no cálculo de recuperação:

$$Re\ c(\%) = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (\text{equação-3})$$

Onde:

$Re\ c(\%)$ = Percentual de recuperação do analito adicionado;

$C1$ = Concentração determinada na amostra adicionada

$C2$ = Concentração determinada na amostra não adicionada, no caso de amostra sintética isenta de analito=0;

$C3$ = Concentração adicionada do analito.

3.3.1.8 Robustez

Robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas, variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal. Em cromatografia gasosa se varia coluna, temperatura e velocidade do gás de arraste, e em espectrofotometria faz-se variação de pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes²⁵. O INMETRO utiliza para esse parâmetro o teste de Younden, que permite avaliar a robustez do método e influência de cada uma das variações. Nesse método são realizados oito ensaios separados para determinar os efeitos da variação de seis ou sete fatores com dois níveis no procedimento analítico. A ordem de execução pode ser aleatória. A Tabela IV mostra a matriz dos fatores para a determinação da robustez, usando a letra maiúscula para o valor nominal do método (nível alto) e a letra minúscula para a variação a ser testado do método (nível baixo)³¹.

Tabela IV: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método^{31, 35}.

Valor do Fator	Combinação Ensaída							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Esse mesmo plano também é chamado de delineamento de Plackett-Burman (PB), experimento fatorial, podendo ser construída uma matriz com 8, 12, 16, 20 e 24 experimentos, sendo a mais utilizada a de 8 corridas, conforme ilustrado na Tabela IV⁴¹. Cabe salientar que essa estratégia estatística permite a avaliação do estudo da variação na metodologia analítica com uma melhor qualidade.

Para calcular o efeito da variação de um fator em relação aos dois níveis utilizados, deve-se encontrar os quatro valores (resultados) correspondentes às letras maiúsculas e às quatro minúsculas e diminuir uma média da outra (média essa considerando cada um dos dois grupos). Por exemplo:

Efeito D/d = $\frac{S + T + Y + Z}{4} - \frac{U + V + W + X}{4}$ ^{31, 35}. Para avaliar se a diferença das médias é significativa, faz-se o uso do cálculo do efeito crítico, a partir do teste t-Student ^{42,43}.

3.3.2 Critérios de Aceitação

Os critérios de aceitação são definidos a partir da legislação vigente dentro do território nacional. Caso não haja nenhuma que tenha abrangência na quantificação do analito em estudo, pode-se usar organizações internacionais como guia, podendo serem estipulados dentro da empresa que usará o método em seu controle de qualidade. Podem-se escolher ainda alguns testes estatísticos para ajudar na avaliação. Os critérios de aceitação utilizados nesse estudo encontram-se descritos no item 4.3.6.

3.3.3 Documentação de Validação Analítica

Todo o processo de validação de metodologia deve ser documentado, pois isso faz parte da rastreabilidade da análise. É importante que todas as etapas da validação sejam registradas, para fins de avaliação e regulamentação, podendo essas serem exigidas por organismos regulamentadores. A documentação e o processo de validação de metodologia analítica devem seguir as normas de boas práticas de laboratório ^{44,45}, e esses devem assegurar que todas as informações foram descritas, de forma que outro analista possa executar o método validado de maneira adequada. Os principais documentos de uma validação são: protocolo de validação de metodologia analítica, procedimento operacional padrão (POP) e relatório de validação analítica.

3.3.3.1 Protocolo de Validação de Metodologia Analítica

O protocolo de validação de metodologia analítica, segundo a AOAC⁴⁶, deve constar os itens mostrados na Tabela V.

Tabela V: Elementos que devem constar no protocolo de validação de métodos ^{46,47}.

Elemento	Indicação
Título	Determinação de dimeticona em simeticona (matéria-prima) por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama.
Objetivo do estudo	Breve descrição dos objetivos do estudo, incluindo os parâmetros de avaliação.
Próposito/Necessidade	Descrição da necessidade do desenvolvimento e da validação do método em questão, mostrando a sua utilização.
Escopo/Aplicabilidade	Descrição do escopo da aplicação para o método proposto, indicando a faixa de concentração adotada, a matriz e o analito que serão estudados.
Amostras	Indicar a aparência da amostra, sua forma de preparação e de armazenamento, e sua estabilidade.
Parâmetros de validação	Especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, linearidade e robustez.
Crítérios de aceitação	Forma de avaliação de cada parâmetro de validação
Procedimento	Princípio, equipamentos, reagentes, materiais, etapas da análise, cálculos, precauções, pontos críticos, estudos preliminares, interferentes, referências, calibração.
Referências Bibliográficas	Literatura utilizada.
Histórico	Normalmente, o protocolo é controlado. Caso ocorra alguma alteração durante a validação, isso deve gerar uma revisão.

3.3.3.2 Procedimento Operacional Padrão

Após realizar todas as análises de validação de metodologia, é necessário que se escreva o procedimento operacional padrão, conhecido por POP, de forma clara e objetiva, sem ambigüidades. O procedimento deve auxiliar a aplicação da metodologia dentro do controle de qualidade, e deve possibilitar a sua execução de maneira correspondente àquela do processo de validação. Caso contrário, o desempenho do método poderá ser diferente do esperado. O guia da ISO 78/2 (2)⁴⁸

indica que o método padrão deve ter em seu procedimento os itens da Tabela VI.

Tabela VI: Elementos que devem constar no procedimento operacional padrão 48,49,50

Elemento	Indicação
Escopo	Breve explicação sobre o que método determina.
Definições	Definição precisa do analito ou parâmetro determinado pelo método.
Campo de Aplicação	Tipo de material/matriz para qual o método é aplicado.
Princípio	Etapas básicas envolvidas no procedimento.
Equipamentos	Especificações dos equipamentos utilizados para a determinação.
Reagentes	Reagentes analíticos com seus respectivos graus de pureza.
Amostragem	Descrição do processo de amostragem.
Procedimento	Dividido em parágrafos numerados ou subclasses, incluindo a preparação da amostra, do padrão e procedimento de medida.
Cálculo e Expressão de Resultados	Indicação da forma de cálculo do resultado final e a unidade na qual o resultado será expresso.
Notas	Informações adicionais sobre o procedimento, podem ser fornecidas sob forma de notas, colocadas no final da página ou no corpo do texto.
Anexos	Inclusão de todas as informações sobre o controle analítico, como tabelas estatísticas, dados de <i>software</i> , etc.
Referências	Referências utilizadas para o desenvolvimento do método.

3.3.3.3 Relatório de Validação de Metodologia Analítica

O relatório de validação é o documento que reúne todos os registros, resultados e avaliação de um processo ou sistema de validação concluída^{51,52}. Ele pode conter os elementos mostrados na Tabela VII.

Tabela VII: Elementos que podem constar no relatório de validação de metodologia analítica ^{51,52}.

Elemento	Indicação
Título	Tipo de determinação estudada.
Aplicabilidade	Indicar matriz, analito, produto.
Princípio	Resumo das etapas básicas do procedimento.
Materiais/Amostras	Reagentes e instrumentos necessários.
Calibração	Padrões de referências utilizados.
Procedimento	Princípio, equipamentos, reagentes, materiais, etapas da análise, cálculos, precauções, pontos críticos, estudos preliminares, interferentes, referências, calibração.
Controle	-
Resultados	Resultados obtidos em cada parâmetro de validação com suas respectivas avaliações, incluindo cálculos de resultados, estatística aplicada.
Conclusão	Definir se o método está apropriado para a sua finalidade.
Referências	Referências bibliográficas utilizadas.
Aprovação	Pessoas envolvidas na elaboração, realização e aprovação da validação de metodologia

3.3.4 Revalidação

A revalidação de metodologia analítica deve ocorrer quando houver: ^{25, 53}

- Mudança na síntese da substância ativa;
- Mudança na produção do produto acabado;
- Mudança no procedimento analítico
- Troca de fornecedor de matéria-prima.

4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1 Caracterização da Matéria-prima

Para avaliação da matéria-prima de simeticona foram utilizadas algumas técnicas analíticas qualitativas, que auxiliaram na sua caracterização, entre elas estão:

- Espectroscopia de infravermelho próximo que é muito utilizada na indústria farmacêutica para no processo de controle de qualidade da matéria-prima utilizada em suas formas farmacêuticas, pois facilita as análises de identificação e qualificação, sendo essas obrigatórias em substâncias ativas.

- Cromatografia de permeação de gel, utilizada para verificação da faixa de massa molecular da matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% e do padrão de referência USP.

- Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa para auxiliar a verificação da especificidade do método cromatografia gasosa com ionização de chama.

4.1.1 Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados nos métodos de qualificação e caracterização da matéria-prima de simeticona emulsão 30% e de simeticona 100% foram os seguintes: padrão primário de polidimetilsiloxano da farmacopéia americana (100,0%, USP, Estados Unidos), tolueno grau HPLC ($\geq 99,9\%$, Carlo Erba, Itália), tolueno grau HPLC ($\geq 99,9\%$, Merck, Alemanha), hexano grau HPLC ($\geq 98,0\%$, Carlo Erba, Itália), hexano ($\geq 98,0\%$, Merck, Alemanha), ácido clorídrico 37% grau analítico (37,7%, Nuclear, Brasil), sulfato de sódio anidro (101,2%, Nuclear, Brasil), água ultrapurificada pelo equipamento de Milli-Q, e tetrahidrofurano destilado e degaseificado.

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos disponíveis para as metodologias quantitativas foram os seguintes:

- Cromatógrafo gasoso modelo 6890, marca Agilent, com detector de massa

de quadrupolo acoplado, modelo 5973, marca Agilent e amostrador automático, modelo 7683, marca Agilent, Estados Unidos.

▪Cromatógrafo de permeação de gel, modelo 510, marca Waters, Estados Unidos, com detector de índice de refração, modelo 410, marca Waters, Estados Unidos.

▪Centrífuga de bancada digital e microprocessada, modelo CT5000, marca Cientec, Brasil;

▪Agitador magnético, modelo RO10, marca IKA, Alemanha.

▪Balança analítica 0,01 mg, modelo CP225D, marca Sartorius, Alemanha.

▪Lavadora ultra-sônica, modelo USC-2800, marca Unique, Brasil.

▪Espectrômetro de absorção molecular no infravermelho próximo, modelo NIR 5000, marca FOSS, Estado Unidos.

4.1.3 Procedimentos de Análise

4.1.3.1 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)

Para qualificação e identificação da dimeticona no infravermelho próximo foi necessária a construção de uma biblioteca válida. Foram realizadas as seguintes etapas para identificação e qualificação:

a) Separação de 24 amostras do estoque para leitura em espectroscópio de infravermelho próximo;

b) Não foi necessária preparação prévia das amostras;

c) Leitura em equipamento de NIRS com sonda de caminho óptico de 10 mm;

d) Tratamento matemático dos espectros de simeticona pela segunda derivada;

e) Escolha da faixa do espectro eletromagnético utilizada para qualificação e validação da biblioteca entre 1100 e 2100 nm.

f) Tratamento matemático por regressão de variação linear múltipla.

f) Leitura de três amostras de matéria-prima para verificação da biblioteca;

g) Leitura de 8 amostras de dimeticona para identificação e qualificação.

4.1.3.2 Espectrometria de Massa

Para verificação cromatográfica foi realizada análise de três amostras: padrão de dimeticona USP, amostra de Simeticona emulsão 30% e amostra de Simeticona 100%.

As amostras foram preparadas de acordo com o método de cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama utilizado no item 4.2.3.

As condições cromatográficas de análise utilizadas foram: temperatura inicial de 40 °C (2 min.), com rampa de aquecimento em taxa de 60 °C/min. até 290 °C, totalizando 60,67 minutos de análise. A razão de split foi 1:20. Coluna cromatográfica HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm).

Obteve-se o espectro de massa dos três primeiros picos do cromatograma, sendo comparados com a biblioteca NIST contida no software MS Search, versão 1.7a.

4.1.3.3 Cromatografia de Permeação de Gel (GPC)

Para análise de determinação de massa molecular mediu-se aproximadamente 10 mg de amostra de matéria-prima de simeticona, sendo essa solubilizada em 4 mL de THF destilado e desgaseificado. O eluente utilizado foi o tetrahidrofurano (THF) com vazão de 1 mL /min e 45°C de temperatura interna. Para calibração utilizaram-se amostras padrão de poliestireno monodisperso.

4.2 Método Quantitativo

4.2.1 Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados nos métodos de quantificação de dimeticona em matéria-prima simeticona emulsão 30% e simeticona 100% foram os seguintes: padrão primário de polidimetilsiloxano da farmacopéia americana (100,0%, USP, Estados Unidos), tolueno grau HPLC (≥99,9%, Carlo Erba, Itália), tolueno grau HPLC ((≥99,9%, Merck, Alemanha), hexano grau HPLC ((≥98,0%, Carlo Erba, Itália), hexano ((≥98,0%, Merck, Alemanha), ácido clorídrico 37% grau analítico (37,7%,

Nuclear, Brasil), sulfato de sódio anidro (101,2%, Nuclear, Brasil) e água ultrapurificada pelo equipamento de Milli-Q.

4.2.2 Equipamentos

Os equipamentos disponíveis para as metodologias quantitativas foram os seguintes:

- Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama, modelo 6890N, marca Agilent, Estados Unidos, e amostrador automático, modelo 7683, marca Agilent, Estados Unidos;
- Espectrômetro de Absorção Molecular no infravermelho, modelo FT Nicolet Avatar 370 DTGS, marca Thermo, Estados Unidos;
- Centrífuga de bancada digital e microprocessada, modelo CT5000, marca Cientec, Brasil;
- Agitador magnético, modelo RO10, marca IKA, Alemanha.
- Balança analítica 0,01 mg, modelo CP225D, marca Sartorius, Alemanha.
- Lavadora ultra-sônica, modelo USC-2800, marca Unique, Brasil.

4.2.3 Preparação das Amostras

4.2.3.1 Padrão e Amostra de Simeticona Emulsão 30%¹

Para o preparo do padrão de Simeticona emulsão 30% foi necessário pesar exatamente, cerca de 800,0 mg do padrão secundário simeticona 30% em um erlenmeyer de 100 mL com rosca. Adicionou-se, volumetricamente, 20,0 mL de tolueno, a seguir fechou-se o frasco e agitou-se por 10 minutos em agitador magnético. Adicionou-se 50 mL de solução de ácido clorídrico:água (2:5). Agitou-se por 30 minutos em agitador magnético. Transferiu-se para pêra de decantação e deixou-se em repouso por 30 minutos. Depois de descartar a fase aquosa, retirou-se uma alíquota de 10 mL da fase orgânica para tubo de centrífuga contendo 1,0 g de sulfato de sódio anidro. Centrifugou-se o tubo e separou-se o sobrenadante para as análises cromatográficas e espectrofotométricas. Concentração final de 12 mg;mL⁻¹.

4.2.3.2 Padrão e Amostra de Simeticona 100%

O padrão de Simeticona 100% foi preparado diferentemente do padrão de dimeticona emulsão 30%, em função desse padrão não estar disperso em água, sua solubilização em hexano foi mais simples. Pesou-se exatamente, cerca de 80,0 mg do padrão secundário Simeticona 100%. Transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL com auxílio de hexano, completando o volume. Homogeneizou-se a solução em ultra-som durante 20 minutos. Procedeu-se a análise cromatográfica e espectrofotométrica. Concentração final de 3,2 mg; mL⁻¹.

4.2.4 Parâmetros de Análise

4.2.4.1 Análise de Cromatografia Gasosa com Detecção de Ionização de Chama

Os parâmetros cromatográficos que foram utilizados para as análises de matéria-prima de Simeticona emulsão 30% e Simeticona 100% estão apresentados na Tabela VIII.

Tabela VIII: Condições cromatográficas da análise de simeticona emulsão 30% e simeticona 100%.

Parâmetro	Simeticona Emulsão 30%	Simeticona 100%
Programação do Forno	0,0 °C/min 80°C 0,5 min 15,0°C/min 180°C 0,0 min 35,0°C/min 300°C 0,4 min	0,0 °C/min 80°C 0,5 min 15,0°C/min 180°C 0,0 min 35,0°C/min 300°C 0,4 min
Temperatura do Injetor	260°C	260°C
Razão de <i>Split</i>	15	5
Temperatura do Detector	290°C	290°C
Gases Detector	H ₂ :N ₂ :ar sintético (30:35:350)	H ₂ :N ₂ :ar sintético (30:35:350)
Fluxo do gás de arraste (N ₂)	1,8 mL/minuto	1,8 mL/minuto
Volume de injeção	2 µL	2 µL
Tempo de retenção (min)	Picos em 2,95, 4,15 e 5,8 (grupo de dimeticona)	Picos em 2,95, 4,15 e 5,8 (grupo de dimeticona)
Coluna	HP-5 J&W Scientific (30m × 0,32mm × 0,25µm)	HP-5 J&W Scientific (30m × 0,32mm × 0,25µm)
Solvente de lavagem	Tolueno	Hexano

4.2.4.2 Análise de Espectroscopia de Absorção Molecular no infravermelho por Transformada de Fourier

Os parâmetros analíticos da análise de espectrofotometria de infravermelho da matéria-prima de simeticona emulsão 30% e Simeticona 100% foram os listados na Tabela IX abaixo.

Tabela IX: Condições espectroscópicas da análise de simeticona emulsão 30% e simeticona 100%.

Parâmetro	Simeticona Emulsão 30%	Simeticona 100%
Número de onda	1260 cm ⁻¹	1260 cm ⁻¹
Região de Absorção	1321 – 1209 cm ⁻¹	1309 – 1209 cm ⁻¹
Janela	KBr	KBr
Espaçador	0,2 mm	0,5 mm
Número de Scans	32	32

4.2.5 Expressão de resultados

Os resultados são expressos como percentual de recuperação do ativo (dimeticona) através das seguintes equações:

$$CP = \frac{Mp \times P}{VP} \quad (\text{equação-4}) \quad CA = \frac{Am \times CP}{Ap} \quad (\text{equação-5})$$

$$CTA = \frac{Ma}{VP} \quad (\text{equação-6}) \quad \% \text{ Recuperação} = \frac{CA}{CTA} \times 100 \quad (\text{equação-7})$$

Onde:

CP = concentração do padrão (mg.mL⁻¹);

Mp = massa pesada do padrão (mg);

P = pureza (%);

VP = volume da pipeta/balão volumétrica (mL);

CA = concentração da amostra (mg.mL⁻¹);

Am = área da amostra (u.a.);

Ap = área do padrão (u.a.);

CTA = concentração teórica amostra (mg.mL⁻¹);

Ma = massa pesada da amostra (mg).

4.3 Estratégia de validação de metodologia analítica

A metodologia utilizada para a validação foi baseada na resolução 899 da ANVISA ²⁵, e os parâmetros e a estratégia utilizados estão, logo a seguir, descritos.

4.3.1 Especificidade/Seletividade

Para verificação da especificidade dos métodos foram comparados os cromatogramas e espectros de uma amostra do diluente utilizado na análise, ou seja, isento do analito, com um padrão de referência do analito em estudo.

4.3.2 Linearidade e Intervalo

Para comprovar a linearidade dos métodos cromatográficos e espectrofotométricos foram construídas curvas de calibração com sete níveis de concentração de dimeticona, sendo que as concentrações foram escolhidas de forma que correspondessem a 50 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % e 150 % da concentração escolhida para alvo.

Para o método de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30% foi utilizada a faixa de 6 a 18 mg.mL⁻¹ de analito e para o método de quantificação de dimeticona em simeticona 100% foi usada a faixa de 1,6 a 4,8 mg.mL⁻¹ de analito, sendo que o valor intermediário de cada faixa foi considerado a concentração alvo de 100%.

Os níveis de concentração utilizados estão descritos na Tabela X.

Tabela X: Níveis de concentração de padrões de dimeticona

Nível de Concentração	Intervalo (%)	Conc Simeticona Emulsão 30% (mg.mL ⁻¹)	Conc Simeticona 100% (mg.mL ⁻¹)
1	50	6,0	1,6
2	80	9,6	2,56
3	90	10,8	2,88
4	100	12,0	3,2
5	110	13,2	3,52
6	120	14,4	3,84
7	150	18,0	4,8

As amostras de padrões foram analisadas em triplicatas e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear.

4.3.3 Exatidão

Para a exatidão foram analisadas nove amostras em cada método, sendo três de concentração baixa (50%), três de concentração média (100%) e três de concentração alta (150%). Cada amostra foi analisada em triplicata.

4.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada de duas formas: repetitividade e precisão intermediária. Para a avaliação do parâmetro de repetitividade foram preparadas seis amostras, mais um padrão de referência na concentração de 100% da concentração alvo, sendo essas analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e em triplicata.

A precisão intermediária foi calculada a partir das amostras de exatidão que foram realizadas em três dias diferentes, em três concentrações: de 50%, 100% e 150% da concentração alvo. Foram calculados: a média das recuperações, o desvio padrão relativo entre as triplicatas e o desvio padrão relativo das recuperações entre os três dias de análise para cada faixa examinada.

4.3.5 Robustez

Para os métodos cromatográficos foram estudadas variações para parâmetros considerados críticos, segundo o experimento fatorial^{31,35,41,54}, sendo os fatores empregados: temperatura inicial do forno, o analista, o fluxo de gás de arraste, o volume de injeção, a razão de *split*, a temperatura do injetor. Os testes realizados estão descritos nas Tabelas XI e XII.

Para efetuar a série de experimentos planejados de acordo com as Tabelas XI e XII, foi utilizada uma preparação do analito na concentração alvo (100%), que foi analisada em triplicata.

Tabela XI: Testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% por cromatografia gasosa.

Parâmetro	Experimento							
	S	T	U	V	W	X	Y	Z
T _{inicial forno} (°C)	80	80	80	80	85	85	85	85
Analista	C	C	A	A	C	C	A	A
Fluxo (mL/min)	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7
V _{injeção} (µL)	2	2	1	1	1	1	2	2
Razão split	15	20	15	20	20	15	20	15
T _{injetor} (°C)	260	265	265	260	260	265	265	260

T: Temperatura; V: volume de injeção.

Tabela XII: Testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100% por cromatografia gasosa.

Parâmetro	Experimento							
	S	T	U	V	W	X	Y	Z
T _{inicial forno} (°C)	80	80	80	80	85	85	85	85
Analista	C	C	A	A	C	C	A	A
Fluxo (mL/min)	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,7
V _{injeção} (µL)	2	2	1	1	1	1	2	2
Razão split	5	10	5	10	10	5	10	5
T _{injetor} (°C)	260	265	265	260	260	265	265	260

T: Temperatura; V: volume de injeção.

Para a espectrometria molecular no infravermelho efetuou-se o estudo de robustez de forma aleatória, variando-se o número de varreduras (*scans*), a marca do solvente e a temperatura ambiente.

4.3.6 Critérios de Aceitação

Os critérios de aceitação utilizados para a validação dos métodos analíticos de cromatografia gasosa e espectrofotometria de infravermelho estão apresentados na Tabela XIII. Esses critérios são utilizados para definir se o método validado pode ser usado para a finalidade a qual se destina. Alguns testes estatísticos foram aplicados e são descritos e discutidos posteriormente com a discussão dos resultados.

Tabela XIII: Parâmetro de validação *versus* Critério de aceitação.

Parâmetro de Validação	Critérios de Aceitação
Especificidade/Seletividade	A amostra branco não deve apresentar pico no tempo de retenção da dimeticona na cromatografia gasosa e nenhuma absorção na região de absorção do analito dimeticona na espectrofotometria de infravermelho
Linearidade	Coeficiente de correlação linear (R^2) maior ou igual a 0,99. Desvio padrão relativo entre triplicatas menor que 5%.
Exatidão	Recuperação de 93 a 107% da concentração alvo. Desvio padrão relativo entre triplicatas menor que 5%.
Precisão	Repetibilidade Recuperação de 93 a 107% da concentração alvo. Desvio padrão relativo intra-dia menor que 5%. Desvio padrão relativo entre triplicatas menor que 5%.
	Intermediária Recuperação de 93 a 107% da concentração alvo. Desvio padrão relativo inter-dias menor que 5%. Desvio padrão relativo entre triplicatas menor que 5%.
Robustez	Recuperação de 93 a 107%. Desvio padrão relativo entre os testes menor que 5%. Desvio padrão relativo entre triplicatas menor que 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Matéria-prima de Simeticona

5.1.1 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho Próximo (NIRS)

A espectroscopia de infravermelho próximo é muito utilizada para a identificação de substâncias farmacêuticas, pois oferece um alto poder de identificação, sendo uma análise rápida, não destrutiva e de quase ou nenhuma preparação de amostra. No caso desse estudo, essa técnica foi utilizada para identificação da matéria-prima de simeticona. Essa identificação, feita a partir de uma biblioteca validada descrita sucintamente no item 4.1.3, é utilizada para certificar que a matéria-prima que está sendo utilizada pertence ao grupo utilizado para a construção da biblioteca.

As figuras 4 e 5 mostram os espectros de amostras de matérias-prima de simeticona utilizadas na preparação da biblioteca no equipamento de NIRS, sendo que a Figura-4 é sem tratamento matemático e a Figura-5, com aplicação da segunda derivada. Para melhor visualização, a Figura-6 apresenta o espectro de apenas uma amostra de matéria-prima de simeticona emulsão 30% na faixa de 1100 a 2300 nm sem tratamento matemático, enquanto que a Figura-7 traz apenas um espectro com a aplicação da segunda derivada.

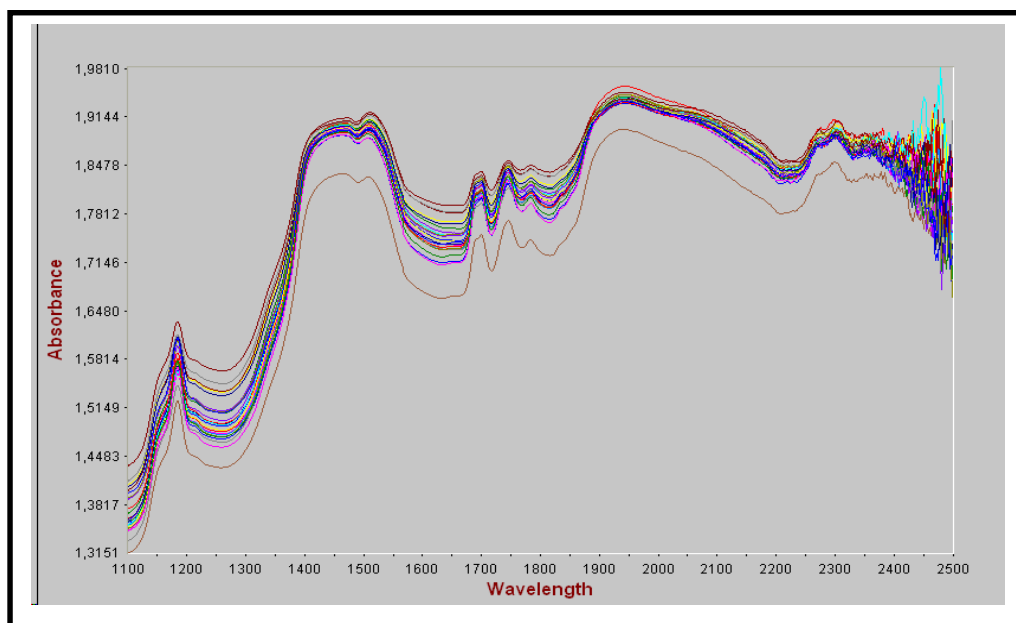


Figura-4: Espectros utilizados na construção da biblioteca de simeticona no espectrômetro de infravermelho próximo.

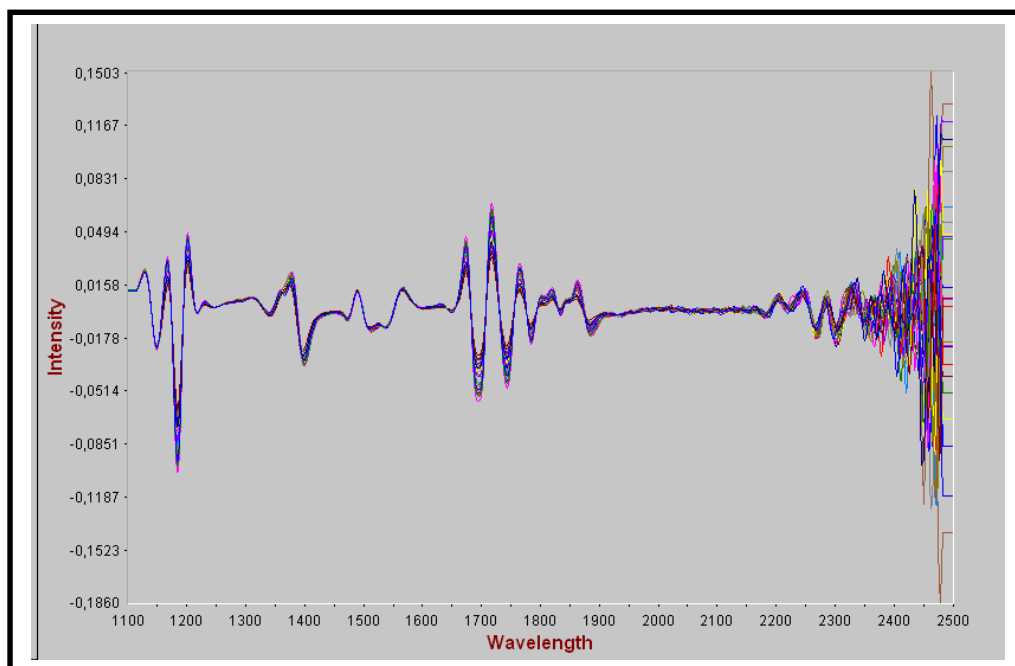


Figura-5: Espectros utilizados na construção da biblioteca de simeticona no espectroscópio de infravermelho próximo aplicado a segunda derivada.

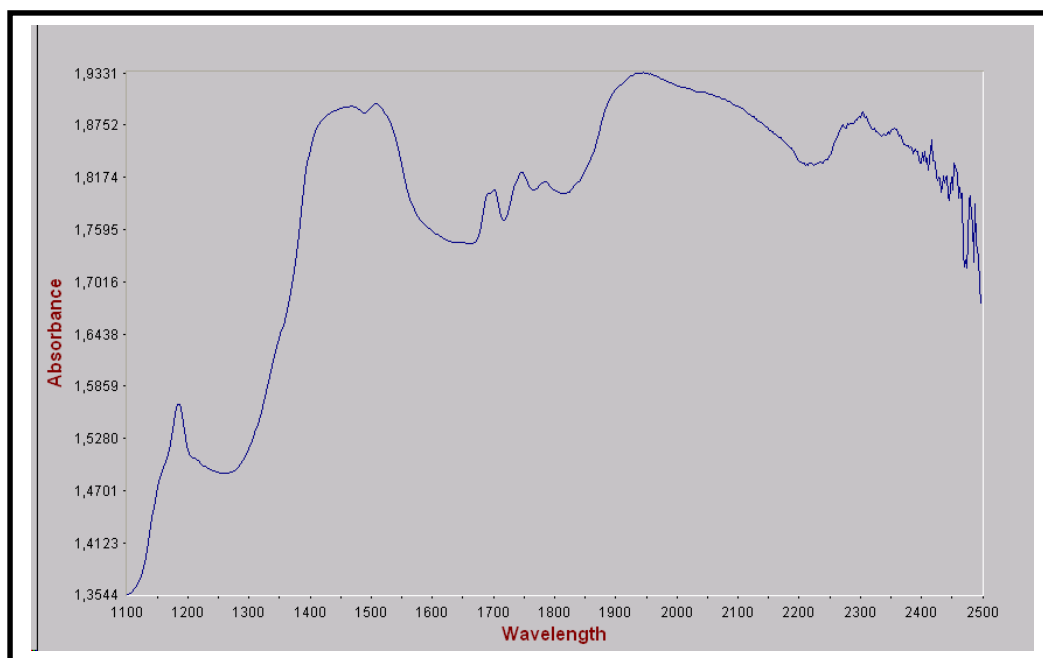


Figura-6: Espectro de uma amostra de Simeticona Emulsão 30%MP no NIRS.

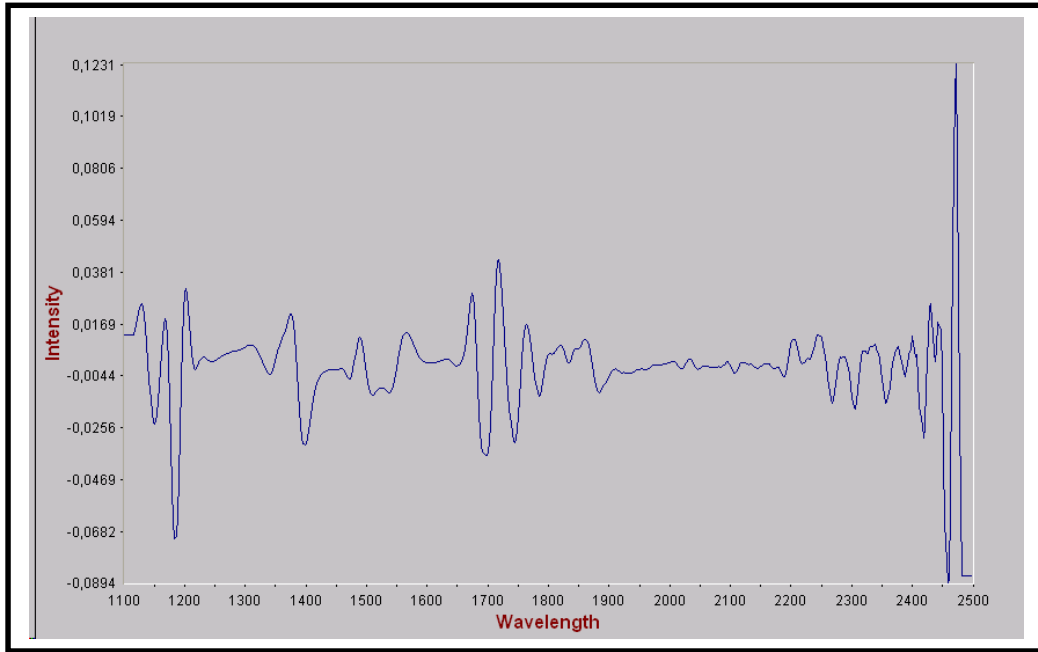


Figura-7: Espectro de uma amostra de Simeticona Emulsão 30% MP aplicada à segunda derivada pelo *software*.

As amostras analisadas por NIRS passaram no teste de identificação e qualificação, indicando que elas pertencem à população utilizada para a construção da biblioteca. A Tabela XIV traz os resultados da identificação de oito amostras de lotes diferentes identificadas no equipamento de NIRS.

Tabela XIV: Resultados de identificação das matérias-primas de simeticona por NIRS.

Data	Horário	Identificação Amostra	Tipo Amostra	Identificação	Resultado Identificação	Pass/Fail	Resultado Qualificação	P/F
17/5/2007	16:25:56	2652	Desconhecida	Simeticona	0,999	Pass	0,999	Pass
17/5/2007	16:29:07	5698	Desconhecida	Simeticona	0,999	Pass	0,999	Pass
17/5/2007	16:31:56	6699	Desconhecida	Simeticona	0,998	Pass	0,998	Pass
17/5/2007	16:34:39	7887	Desconhecida	Simeticona	1,000	Pass	1,000	Pass
17/5/2007	16:38:47	9468	Desconhecida	Simeticona	1,000	Pass	1,000	Pass
17/5/2007	16:41:46	11756	Desconhecida	Simeticona	0,998	Pass	0,998	Pass
17/5/2007	16:44:37	13393	Desconhecida	Simeticona	0,999	Pass	0,999	Pass
17/5/2007	16:49:21	16430	Desconhecida	Simeticona	0,999	Pass	0,999	Pass

5.1.2 Espectrometria de Massa

Para verificação da especificidade do método de cromatografia gasosa foi utilizado um detector de massa quadrupolo para identificação de siloxanos. A partir da biblioteca contida no *software* utilizado pelo equipamento, os cinco primeiros picos que saem separados pela coluna cromatográfica potencialmente correspondem a polidimetilsiloxanos. As figuras 8, 9 e 10, apresentam o espectro dos três primeiros picos utilizados na validação de metodologia na técnica de cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama.

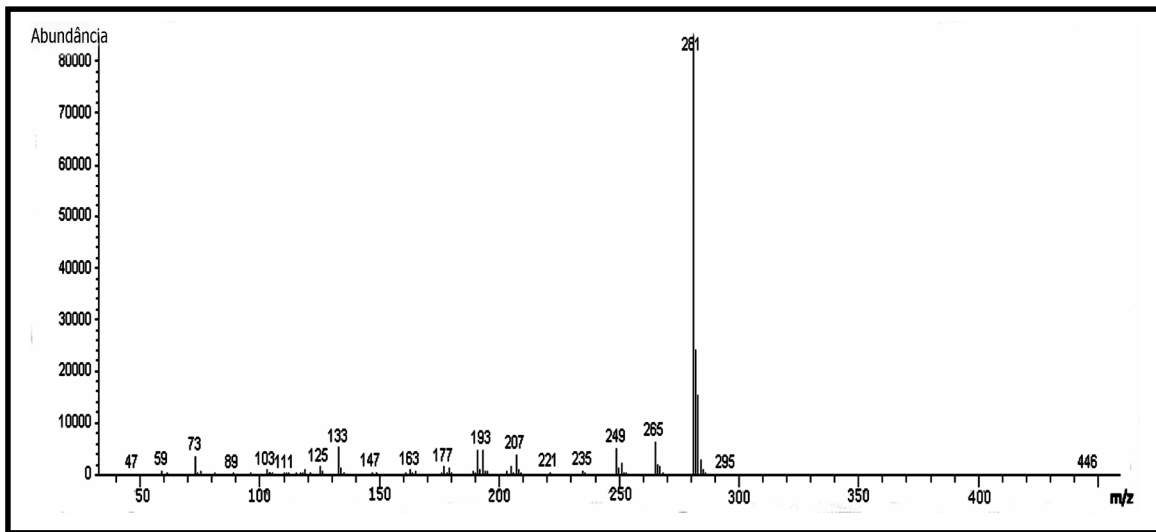


Figura-8: Espectro do primeiro pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona.

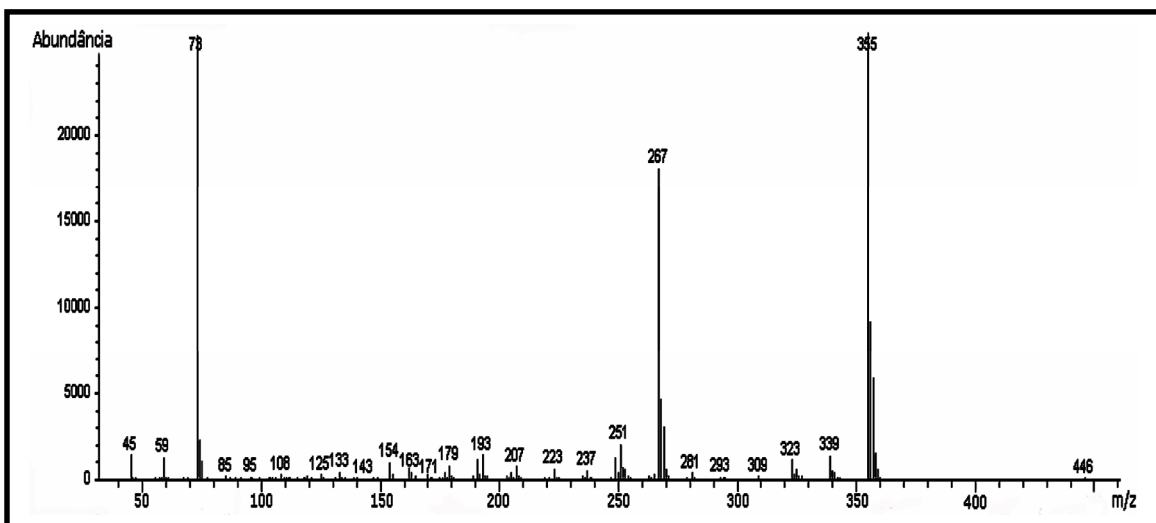


Figura-9: Espectro do segundo pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona.

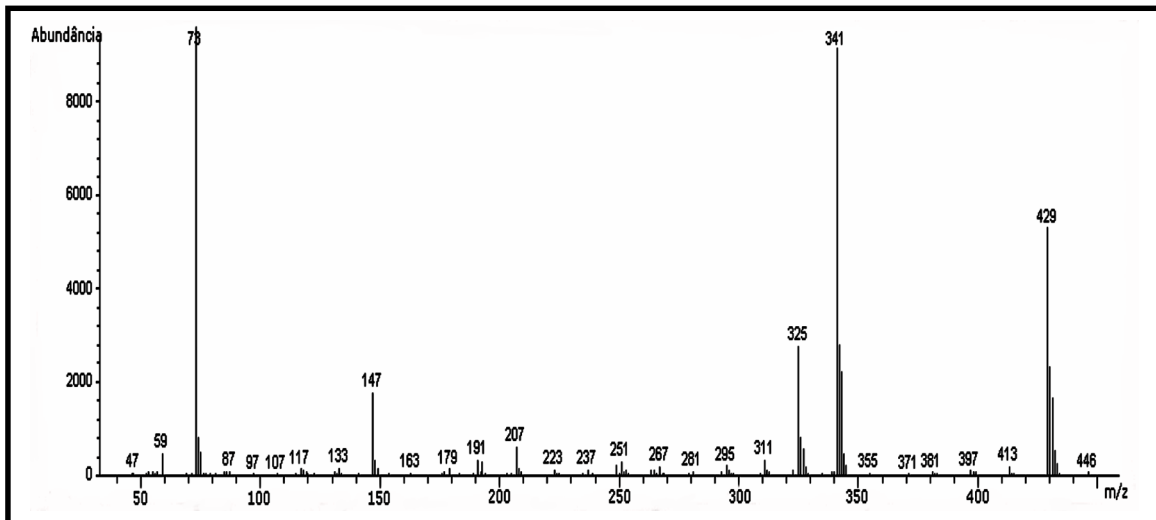


Figura-10: Espectro do terceiro pico de dimeticona utilizado para a quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona.

5.1.3 Cromatografia de Permeação de Gel

Na cromatografia de permeação de gel, onde a separação cromatográfica é realizada por exclusão, utilizando como detecção o índice de refração da fase móvel que é tetrahydrofurano (THF) como referência, os cromatogramas obtidos são aqueles mostrados nas Figuras 11, 12 e 13. Poucas conclusões dessa caracterização, contudo, pode-se comentar que as duas amostras de matérias-primas utilizadas (uma de simeticona 100% e outra de simeticona emulsão 30%) têm a mesma variação de massa molecular que o padrão de referência de polidimetilsiloxano USP.

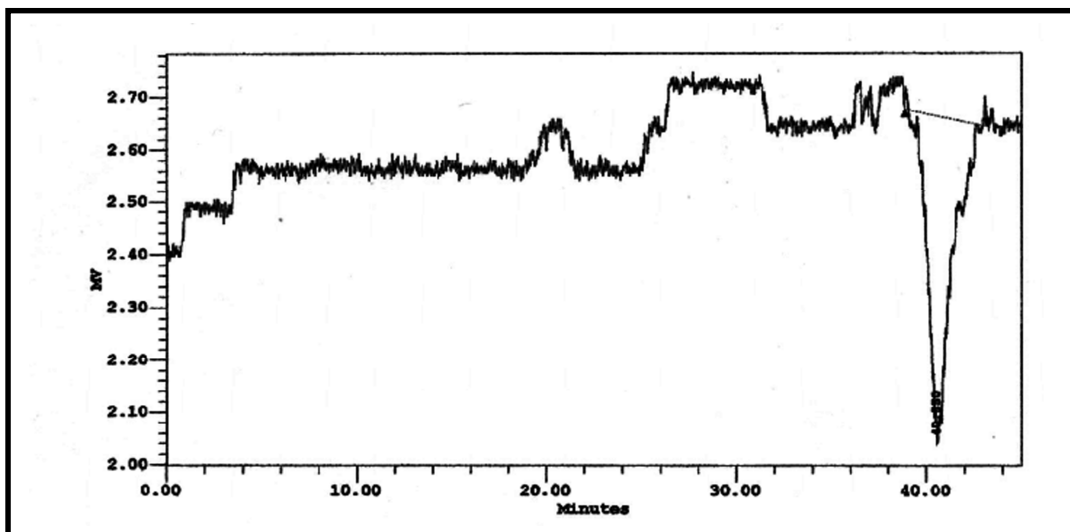


Figura-11: Cromatograma do padrão USP de polidimetilsiloxano por cromatografia de permeação de gel.

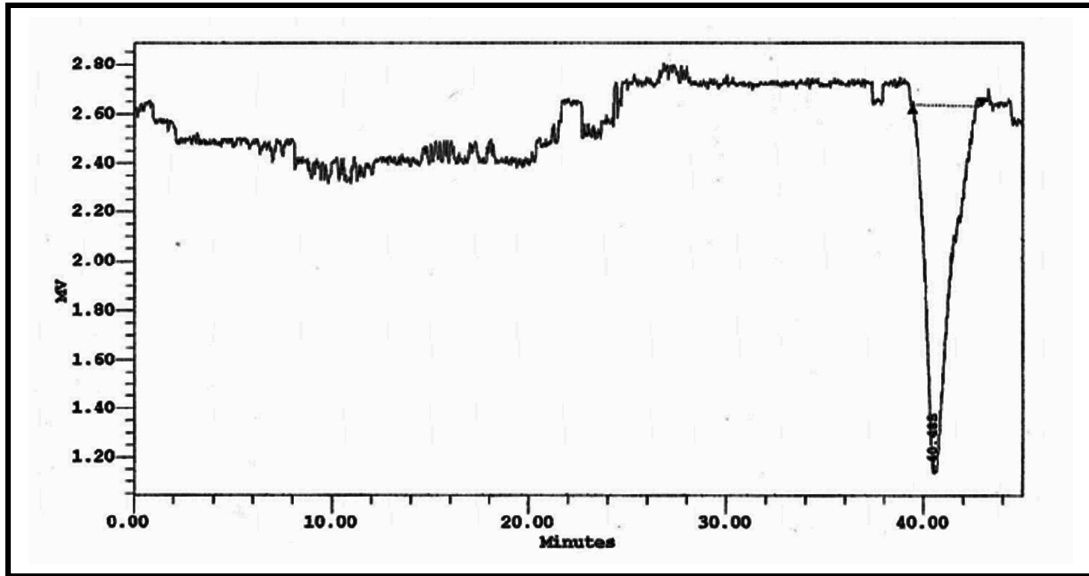


Figura-12: Cromatograma da amostra de simeticona emulsão 30% por cromatografia de permeação de gel.

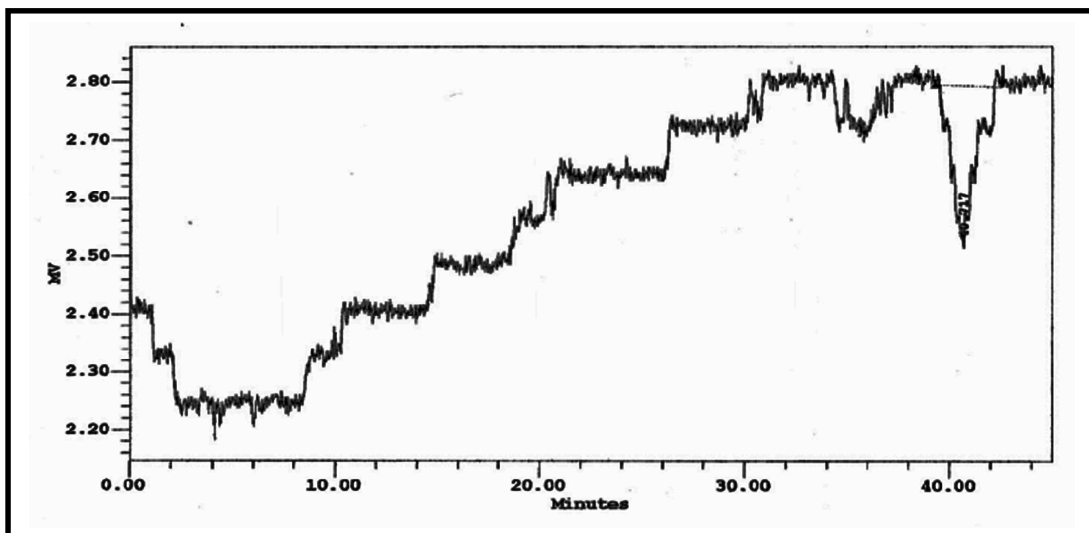


Figura-13: Cromatograma da amostra de simeticona 100% por cromatografia de permeação de gel.

5.2 Padronização do Padrão de Dimeticona

A utilização de materiais de referência é de extrema importância no processo de validação, sendo que esses devem ser de origem analítica conhecida e confiável, normalmente de uma síntese ou purificação de compostos técnicos, passíveis de rastreabilidade. Esse tipo de substância, invariavelmente, é de alto custo, e muitas vezes não está disponível para venda. No caso desse estudo, o padrão primário foi comprado da farmacopéia americana (USP), uma ampola com 200 mg de padrão,

podendo ser usado uma única vez. Por esse motivo, escolheu-se uma amostra de matéria-prima de simeticona 100% e uma amostra de matéria-prima de simeticona emulsão 30% para serem utilizadas como material de referência, de forma a viabilizar o processo de validação.

Para realização da padronização, empregou-se o método, considerado validado, da USP, usando a técnica de espectroscopia de absorção molecular no infravermelho por transformada de Fourier(FTIR), disposto na monografia da simeticona emulsão 30%¹. A preparação do padrão e das amostras é igual ao procedimento descrito no item 4.2.3.1, com exceção da massa utilizada, que foi de 50 mg, indicada pelo compêndio americano. A análise foi realizada com três replicatas de cada matéria-prima e a média encontrada para a amostra de simeticona 100% foi de 100,52% e para a amostra de simeticona emulsão 30% foi de 27,39%. Essas amostras, então, foram utilizadas como padrão de trabalho para a preparação das amostras de todo o processo de validação de metodologia analítica.

5.3 Validação de Metodologia Analítica

5.3.1 Simeticona Emulsão 30%

5.3.1.1 Especificidade/Seletividade

No método cromatográfico, no cromatograma da amostra branco não se observou nenhum pico no tempo de retenção do analito em estudo e no método por infravermelho, no espectro da amostra branco não se obteve nenhuma absorção na região da dimeticona entre 1321 e 1209 cm^{-1} .

A seguir, as Figuras 14 a 18 apresentam os cromatogramas e espectros do padrão de concentração 100% do alvo estipulado e da amostra Branco do método de cromatografia gasosa e do método de espectroscopia de infravermelho de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

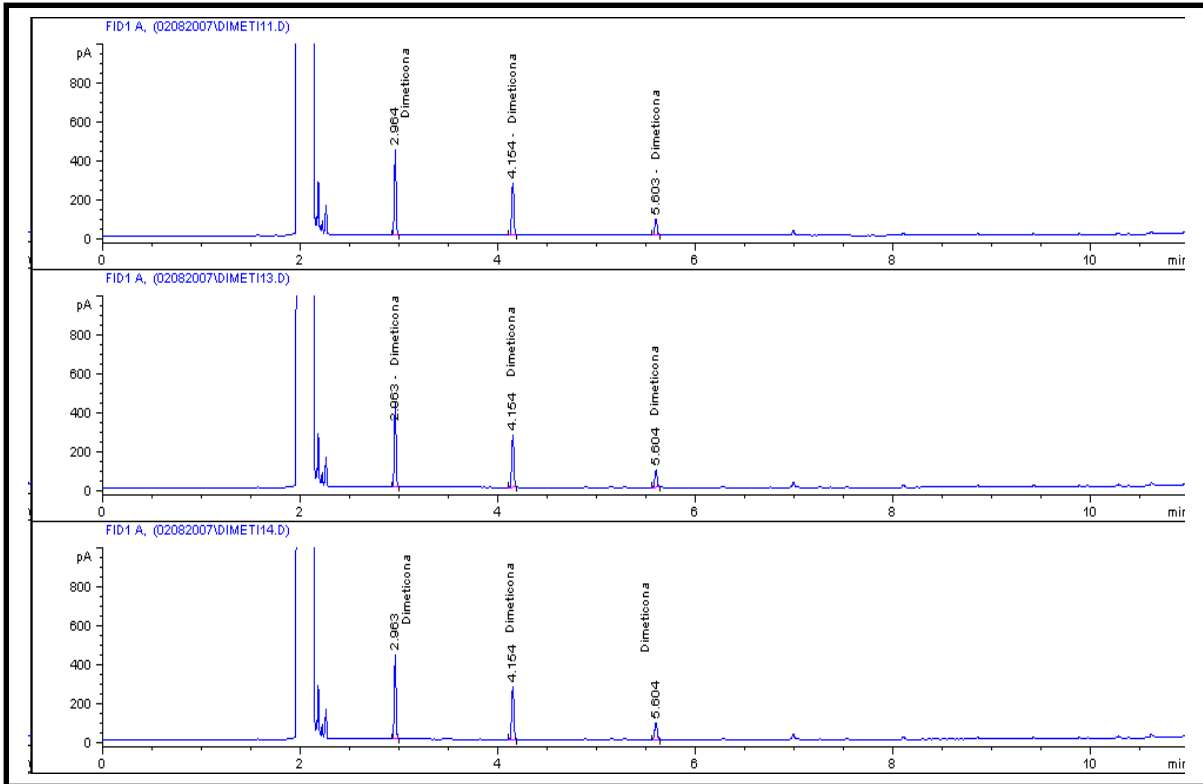


Figura 14: Cromatogramas das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por cromatografia gasosa para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%

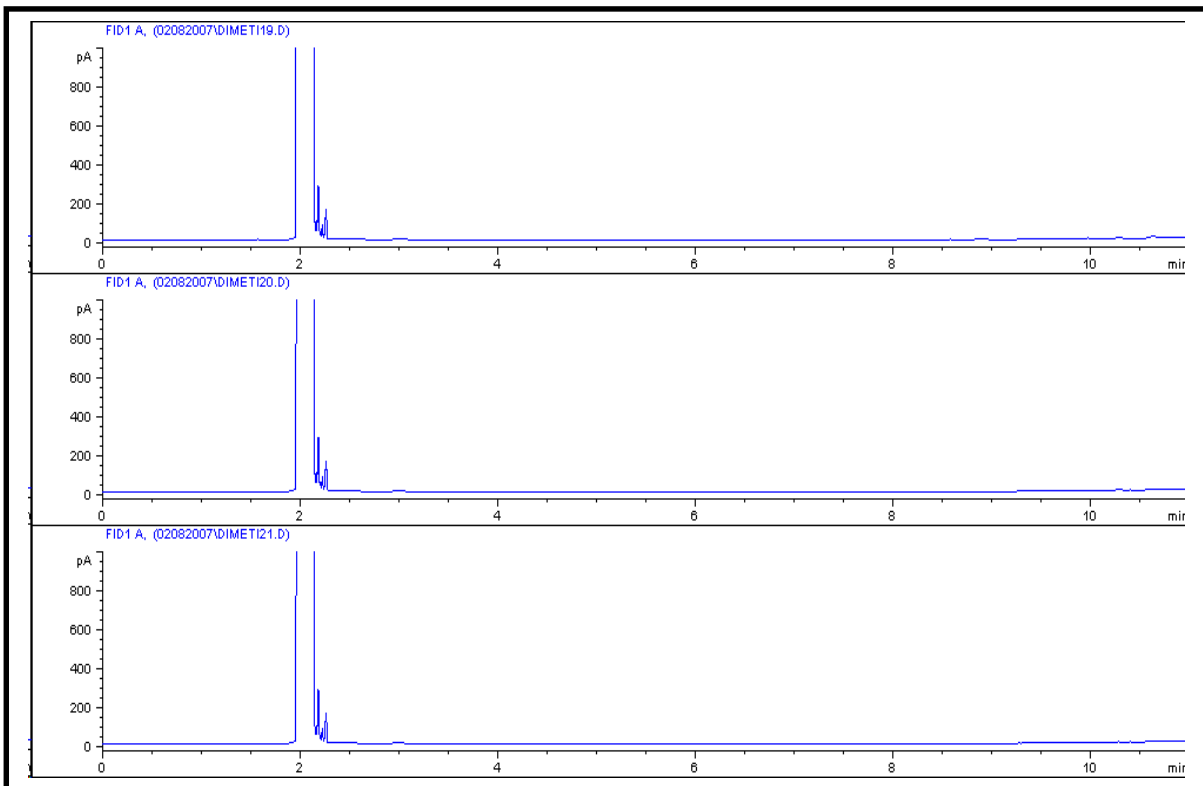


Figura 15: Cromatogramas das triplicatas da amostra Branco (tolueno) por cromatografia gasosa para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%.

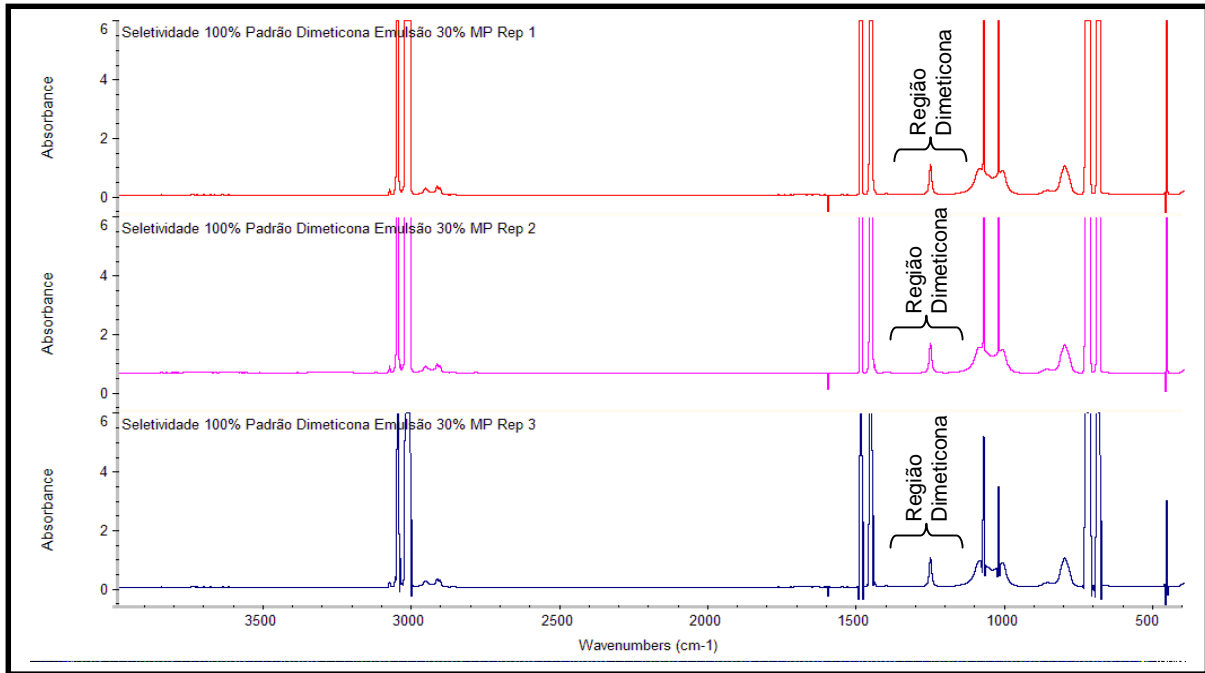


Figura 16: Espectros das triplicatas do padrão de referência de dimeticona do método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%

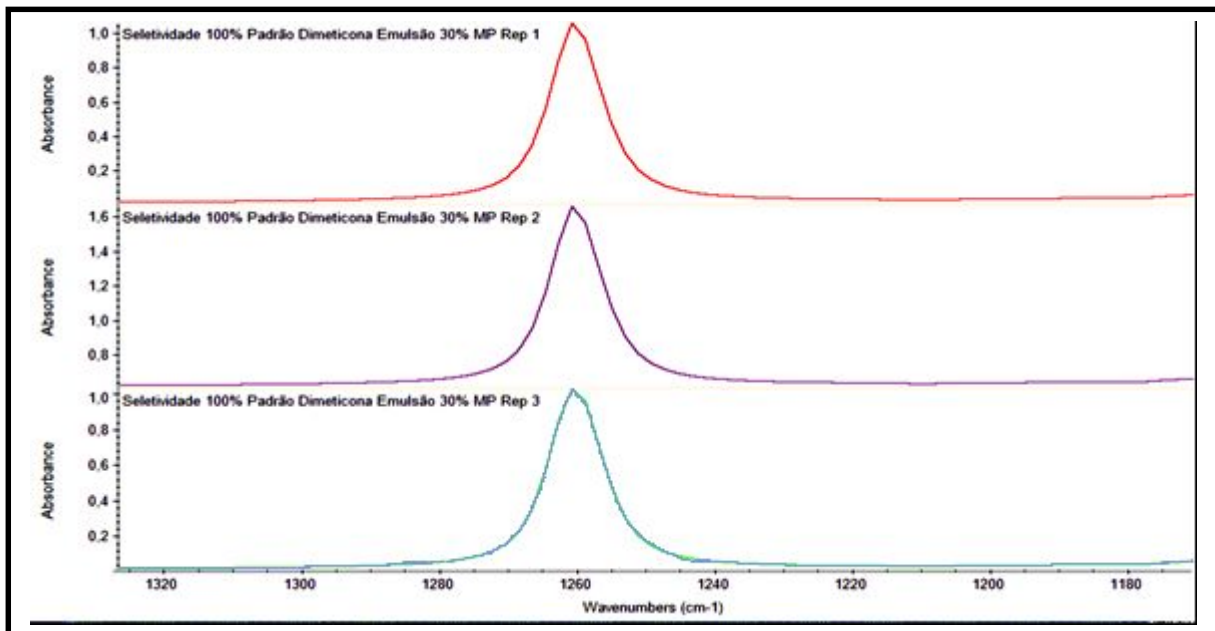


Figura 17: Expansão da região de absorção utilizada no método de quantificação de dimeticona por infravermelho.

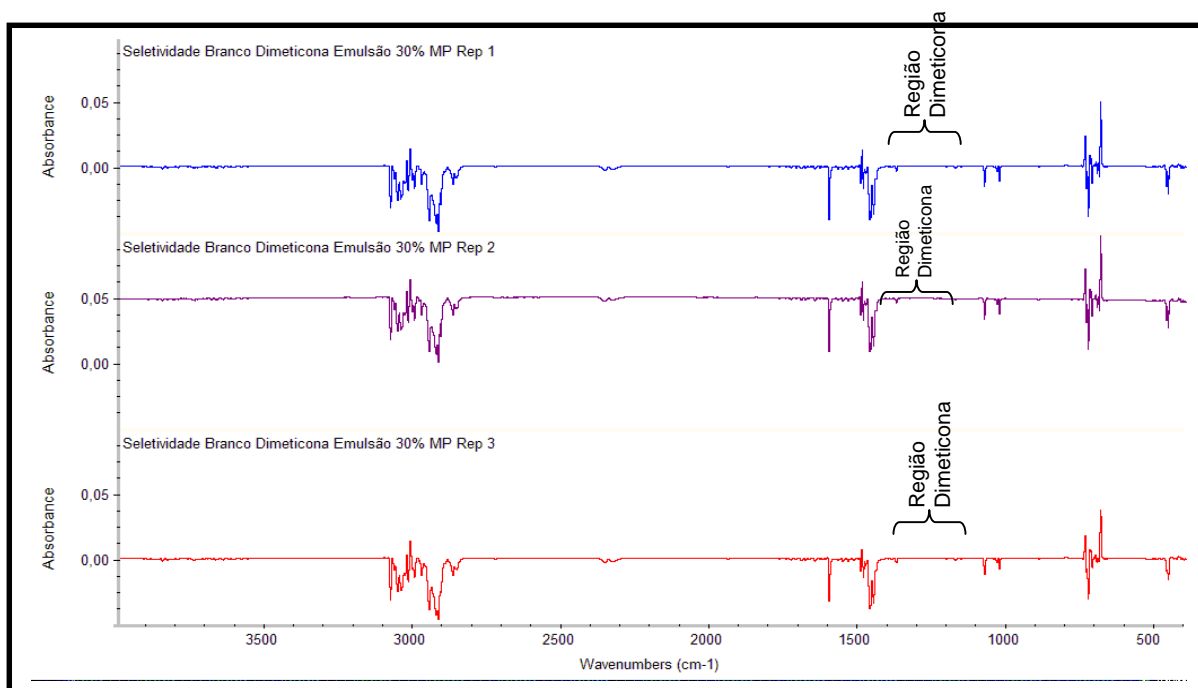


Figura-18: Espectros das triplicatas da amostra Branco (tolueno) do método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona emulsão 30%

5.3.1.2 Linearidade e Intervalo

A Tabela XV apresenta os resultados das áreas dos sinais cromatográficos (GC-FID) e por infravermelho (FTIR) para a série de padrões sintéticos avaliados. A Figura 19 mostra a curva de linearidade construída.

Tabela XV: Linearidade e Intervalo dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Padrão dimeticona	Intervalo (%)	Concentração calculada (mg.mL ⁻¹)	Área GC-FID (u.a.)	Área FTIR (u.a.)
1	50	5,68	611,8775	6,2480
2	80	9,12	948,2898	10,8639
3	90	10,28	1066,5217	12,4627
4	100	11,40	1163,6624	13,4723
5	110	12,52	1282,7044	14,4499
6	120	13,66	1373,3000	16,2843
7	150	17,12	1703,3488	19,3449

GC: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

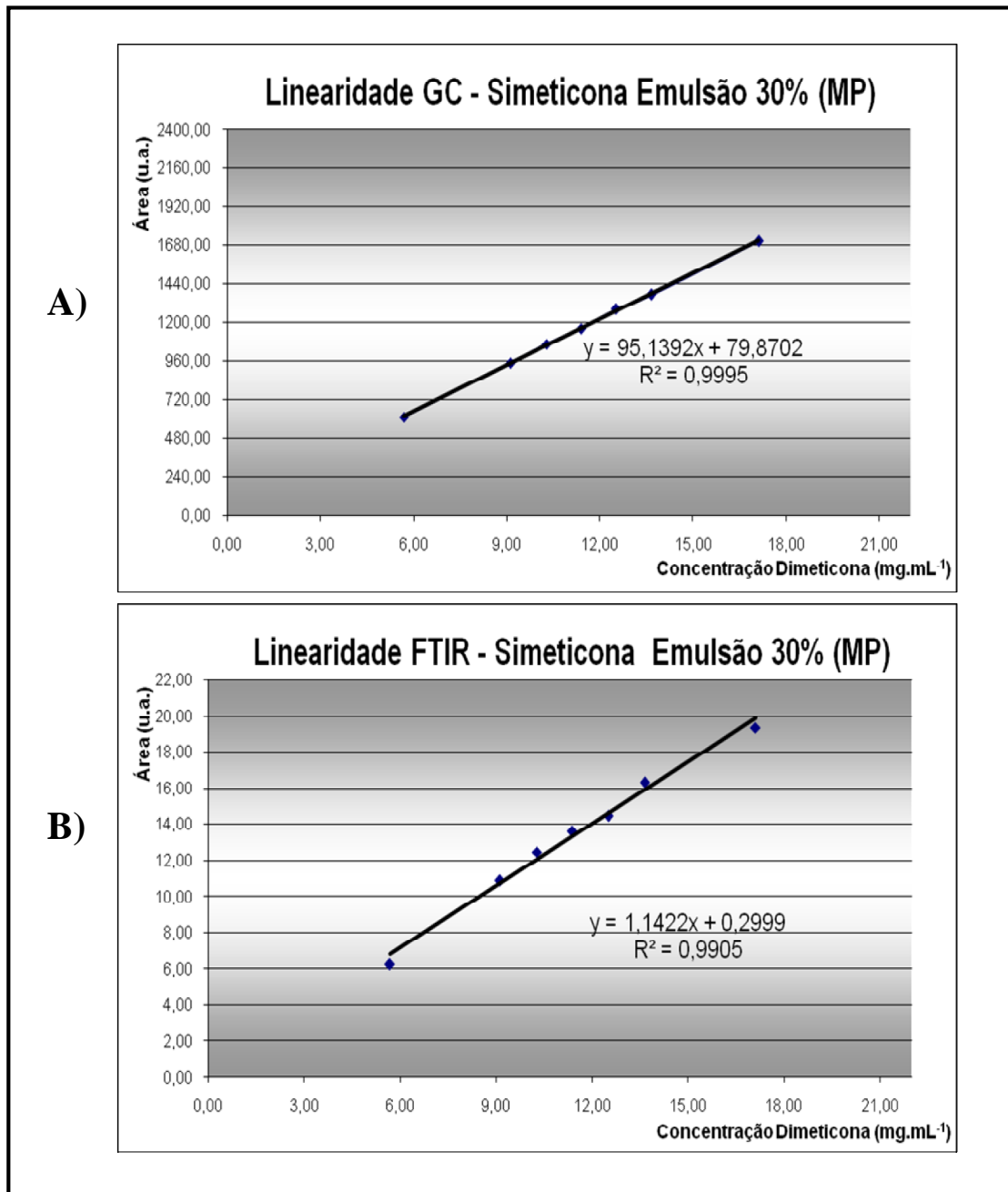


Figura 19: Variação da área em função da concentração de dimeticona: A) cromatografia gasosa B) espectroscopia de infravermelho.

A partir do método dos mínimos quadrados, com o auxílio do *software* Excel do Windows, estimaram-se a equação da reta da relação entre a área (sinal) e a concentração de dimeticona e o coeficiente de correlação linear, para cada método. A Tabela XVI apresenta o resumo dos resultados.

Tabela XVI: Resumo de resultados da regressão linear dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Método	Coefficiente angular	Parâmetro de linearidade	Equação	Coefficiente de correlação linear (R ²)
GC-FID	95,14	79,87	Y=95,14X+79,87	0,9995
FTIR	1,14	0,30	Y=1,14X+0,30	0,9905

*Y se refere à área medida e o X se refere à concentração de dimeticona em mg.mL⁻¹; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Os coeficientes de correlação obtidos estão acima de 0,99, estando dentro do critério de aceitação, sendo que o método cromatográfico apresentou maior correlação linear entre a concentração obtida e a concentração teórica.

Na avaliação da linearidade da curva obtida foi utilizado o teste de validade da regressão onde se utilizou o método estatístico de análise de variâncias (ANOVA), pelo método dos mínimos quadrados, para um modelo linear. Os valores que se obtiveram para o cálculo dentro dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30% estão descritos na Tabela XVII.

Tabela XVII: Resumo de resultados da ANOVA dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Método	Fonte de Variação	Graus de liberdade (v)	Soma dos quadrados (SQ)	Média Quadrática (MQ)	F
GC-FID	Regressão	1	2127980	2127980	33805,5
	Resíduo	19	1196,009	62,9478	
	Total	20	2129176		
FTIR	Regressão	1	306,6905	306,690	1989,00
	Resíduo	19	2,9293	0,1542	
	Total	20	309,620		

GC: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; F: razão entre MQ da regressão e o MQ do resíduo.

Observando a Tabela XVII pode-se concluir que a análise de variância com $F = QM_{Reg}/QM_{Res}$ obteve um valor de F bem maior que $F_{crítico\ 5\% (1,19)} = 4,381$ ⁵⁵, indicando que $a \neq 0$, o que significa, que em nível de confiança de 95%, que a inclinação da reta da regressão não é nula, ou seja há regressão⁵⁶.

Para verificação de dados discrepantes na curva de linearidade aplicou-se o teste de Grubbs, sendo esse um teste que é utilizado para a tomada de decisão de

valores de *outliers* (valores distantes da média). Os resultados encontrados foram os expostos na Tabela XVIII.

Tabela XVIII: Resumo de resultados do teste de Grubbs dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Método	Média Geral	DP Geral	G Mín	G Máx	G Crítico
GC-FID	1164,2	326,3	1,704	1,663	2,557
FTIR	13,30	3,934	1,794	1,537	2,557

DP:desvio-padrão; GMin:valor mínimo de Grubbs; GMáx:valor máximo de Grubbs; Gcrítico:valor tabelado de Grubbs para 21 graus de liberdade. GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Em função dos valores encontrados para G máximo e G mínimo serem menores do que o G crítico, pode-se afirmar que não existem dados discrepantes para os blocos de dados encontrados para os métodos em estudo.

Com o auxílio do *software* Assistat⁵⁷ foi verificada a normalidade dos conjuntos de resíduos obtidos a partir do ajuste de modelo da regressão linear dos métodos cromatográfico e espectroscópico. A avaliação foi realizada aplicando o método de Anderson-Darling e Shapiro-Wilk, sendo que os dados foram considerados de distribuição normal.

Para o teste de homoscedasticidade^a foram utilizados os métodos de Bartlett e Cochran, realizando análise de variâncias dos níveis das concentrações, para verificação de homogeneidade, tanto para a cromatografia quanto para a espectroscopia. Os resultados estão expostos nas Tabelas XIX e XX.

Tabela XIX: Resumo de resultados do teste Bartlett dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Método	χ^2 Calculado	χ^2 tabelado α 5%	Homogêneo
GC-FID	11,289	12,592	sim
FTIR	2,552	12,592	sim

GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

^a A homoscedasticidade (homogeneidade de variância) é uma suposição relacionada primariamente a relações de dependência entre variáveis. Refere-se à suposição de que as variáveis dependentes exibem níveis iguais de variância ao longo do domínio das variáveis preditoras.

Tabela XX: Resumo de resultados do teste Cochran dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Método	Padrão	50%	80%	90%	100%	110%	120%	150%
GC-FID	Área 1	608,24	950,17	1065,46	1162,11	1281,79	1374,17	1706,91
	Área 2	616,81	945,39	1067,15	1164,13	1283,22	1374,18	1696,27
	Área 3	610,56	949,22	1066,96	1164,74	1283,11	1371,54	1706,87
	Média	611,88	948,26	1066,52	1163,66	1282,70	1373,30	1703,35
	DP	4,42	2,53	0,92	1,37	0,80	1,52	6,13
	V	19,58	6,40	0,86	1,89	0,64	2,31	37,57
	DPR	0,72	0,27	0,087	0,12	0,062	0,11	0,36
$\Sigma V=69,23$ $C_{cal}=0,5426$ $C_{tab\ 5\%}=0,5612$								
FTIR	Área 1	6,2496	10,866	12,466	13,582	14,454	16,288	19,350
	Área 2	6,2502	10,872	12,467	13,573	14,456	16,289	19,352
	Área 3	6,2443	10,853	12,455	13,561	14,440	16,275	19,332
	Média	6,2480	10,864	12,463	13,572	14,450	16,284	19,345
	DP	3,25E-03	9,99E-03	6,79E-03	1,07E-02	8,98E-03	7,96E-03	1,12E-02
	V	1,05E-05	9,97E-05	4,61E-05	1,14E-04	8,06E-05	6,34E-05	1,25E-04
	DPR	5,20E-02	9,19E-02	5,45E-02	7,87E-02	6,21E-02	4,89E-02	5,78E-02

$\Sigma V=5,395E-04$ $C_{cal}=0,23165$ $C_{tab\ 5\%}=0,56120$

DP=desvio-padrão; V=variância; DPR=desvio-padrão relativo; ΣV =soma da variância; C_{cal} =valor de Cochran calculado; $C_{tab\ 5\%}$ =valor tabelado de Cochran com 95% de confiança. GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

No teste de Bartlett, teste de comparação de variâncias, obteve-se $\chi^2_{Calculado}$ menor que o $\chi^2_{tabelado}$, mostrando, assim, que a curva de calibração obtida a um limite de significância de 5% é aceita na avaliação de homogeneidade.

Os valores de Cochran calculados foram inferiores ao valor tabelado, indicando que o método é homoscedástico para o intervalo de linearidade escolhido para os métodos cromatográfico e espectroscópico de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

5.3.1.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo percentual de recuperação do analito (equação-8), pelo erro relativo (equação-9) e pelo desvio-padrão relativo (DPR) entre as triplicatas.

$$\% \text{Rec} = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teo}}} \times 100 \quad (\text{equação-8})$$

Onde:

$\% \text{Rec}$ = Percentual de recuperação do analito;

C_{exp} = Concentração encontrada experimentalmente;

C_{teo} = Concentração teórica do analito.

$$ER = \frac{\text{Rec} - R_{\text{ver}}}{R_{\text{ver}}} \times 100 \quad (\text{equação-9})$$

Onde:

ER = Erro relativo em percentual (%);

Rec = valor obtido experimentalmente ou média dos valores obtidos experimentalmente;

R_{ver} = valor considerado como verdadeiro.

A Tabela XXI mostra que as recuperações ficaram entre 98 e 102 % para o método cromatográfico, enquanto que para o espectrométrico ficou entre 95 e 104 % de recuperação. Cada amostra preparada para exatidão foi analisada três vezes e o desvio-padrão relativo entre as triplicatas foi inferior a 1 %, estando dentro do critério de aceitação do parâmetro de validação. A Tabela XXI também traz o erro relativo da recuperação do analito adicionado, indicando que todos os valores encontrados para a recuperação estão dentro do critério de aceitação estipulado no item 4.3.6.

Tabela XXI. Resumo da Exatidão e Precisão Intermediária dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

	EXATIDÃO					PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
	Dia	Amostra	Rec (%)	DPR _{TRI} (%)	ER (%)	Média _{ED} (%)	DP _{ED} (%)	DPR _{ED} (%)	Teste t-Student 1%
GC-FID	1	50	101,1	0,11	1,1	99,2	1,59	1,60	-0,836
	2	50	98,3	0,57	-1,7				
	3	50	98,3	0,14	-1,7				
	1	100	100,4	0,48	0,38	99,7	1,09	1,09	-0,428
	2	100	100,3	0,21	0,34				
	3	100	98,5	0,22	-1,5				
	1	150	99,4	0,35	-0,60	99,2	0,59	0,59	-2,260
	2	150	98,6	0,31	-1,4				
	3	150	99,7	0,33	-0,28				
FTIR	1	50	98,8	0,06	-1,2	99,3	3,86	3,89	-0,312
	2	50	95,7	0,05	-4,3				
	3	50	103,4	0,76	3,4				
	1	100	100,6	0,06	0,57	100,1	0,93	0,93	-0,239
	2	100	99,1	0,05	-0,94				
	3	100	100,8	0,07	0,76				
	1	150	99,8	0,06	-0,15	98,9	2,59	2,61	-0,713
	2	150	96,0	0,06	-4,0				
	3	150	100,9	0,06	0,94				

Rec = percentual de recuperação do analito adicionado; ER = erro relativo; DPR_{TRI}= desvio padrão relativo entre as triplicatas; DP_{ED} = desvio-padrão entre dias; DPR_{ED}=Desvio-padrão relativo entre dias; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

5.3.1.4 Precisão

5.3.1.4.1 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi calculada a partir das amostras de exatidão que foram realizadas em três dias diferentes em três concentrações: de 50%, 100% e 150% da concentração alvo. Foi realizada a média entre as recuperações dos três dias, sendo calculado o desvio-padrão entre dias e o desvio-padrão relativo entre dias, conforme demonstrados na Tabela XXI.

Para a precisão intermediária, de acordo com a Comunidade Européia⁵⁸, pode-se usar a equação de Horwitz (equação-10) para calcular o limite do desvio-padrão relativo. O valor obtido usando a concentração de 12 mg.mL⁻¹ foi de 3,89%. Os resultados de DPR obtidos nesse parâmetro de validação estão dentro do limite estipulado pela equação de Horwitz e pela RE 899 da ANVISA²⁵. Dessa forma, os métodos podem ser considerados precisos.

Para verificar a exatidão das medidas da precisão intermediária utilizou-se o teste t-Student com nível de confiança de 95%, com n=3 e graus de liberdade igual a 2, para cada nível avaliado. Os valores de t calculados (Tabela XXI) resultaram todos menores que o t crítico (4,30), indicando que os valores de recuperações encontrados podem ser considerados iguais a 100%.

Pode-se concluir, então, que a precisão intermediária está dentro dos critérios de aceitação estipulados nesse estudo.

5.3.1.4.2 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada pelo desvio-padrão relativo (DPR%) entre as seis amostras analisadas no mesmo dia, com mesmo equipamento, mesmo analista e mesmas condições ambientais, sendo também utilizados como critério de aceitação os desvios-padrão relativos entre as triplicatas e o teor de recuperação entre 93 e 107%. Em todos eles esse parâmetro foi aceito (Tabela XXII).

Estatisticamente, pode-se usar o coeficiente de variação (CV%) ou desvio-padrão relativo (DPR%) calculado da equação de Horwitz (equação-10) multiplicado por 0,667 para avaliação da precisão intra-laboratorial (repetibilidade), conforme referência da Comunidade Européia.^{58,59,60} O valor encontrado nesse cálculo com fração de massa de 12×10⁻³ foi de 2,594, ficando somente o método de cromatografia gasosa dentro desse parâmetro. Contudo, o método espectroscópico pode também ser considerado preciso, de acordo com o critério de aceitação estabelecido para esse estudo, embasado na legislação da vigilância sanitária²⁵ de desvio-padrão relativo de no máximo 5%.

$$CV\% \text{ ou } DPR\% = 2^{(1-0,5\log C)}, \quad (\text{equação-10})$$

Onde:

C = concentração do analito no experimento expresso em fração de massa como expoente de 10 (ex. 1 mg/g=10⁻³).

Tabela XXII: Resumo dos resultados do parâmetro de repetibilidade dos métodos de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30%.

Amostras 100 %	Recuperação GC-FID		Recuperação FTIR	
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
Amostra A	100,2	0,16	104,0	0,04
Amostra B	98,8	0,18	97,2	0,04
Amostra C	99,4	0,21	103,1	0,04
Amostra D	98,5	0,36	105,8	0,05
Amostra E	98,8	0,08	105,7	0,04
Amostra F	98,8	0,09	103,9	0,04
Média (%)	99,1		103,3	
DP (%)	0,61		3,18	
DPR (%) _{EA}	0,62		3,08	
Teste t-Student 5%	-3,708		2,532	
t-Student crítico (0,01,5) bicaudal	4,032		4,032	
CV Horwitz calculado (%)	2,594		2,594	

GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão; EA: entre amostras; CV: coeficiente de variação.

O teste t-Student de comparação da média obtida das recuperações de analito adicionado com o valor de recuperação esperado fornece a informação com base estatística de exatidão do método a partir das recuperações da repetibilidade. A equação-11 pode ser empregada nesse estudo⁶¹.

$$t = \frac{Ro\% - Re\%}{DP/\sqrt{n}} \quad (\text{equação-11})$$

Onde:

t = valor de t calculado

$Ro\%$ = valor de recuperação do analito adicionado (%)

$Re\%$ = valor de recuperação esperado (%)

DP = desvio-padrão das repetições de amostra

n = número de repetições

Os valores de t calculado para os métodos de quantificação para simeticona emulsão 30% foram -3,708 para a cromatografia e 2,532 para a espectroscopia, sendo ambos menores do que o valor de t tabelado para um nível de confiança de 99%, graus de liberdade igual 5 e bicaudal, que é 4,032, aceitando-se assim, a hipótese nula de que a média gerada pelas amostras é igual ao valor esperado de 100%.

5.3.1.5 Robustez

O elemento de robustez para o método de cromatografia gasosa foi avaliado com o auxílio do plano de Younden³¹, também conhecido como matriz de Plackett-Burman⁵⁴, utilizando planejamento fatorial. Os resultados dos testes de robustez do método cromatográfico para recuperação do analito adicionado seguem na Tabela XXIII, estando os valores obtidos dentro do critério de aceitação.

Tabela XXIII: Resultados dos testes de recuperações do analito adicionado para a robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de Simeticona emulsão por cromatografia gasosa.

Experimento	Recuperação GC-FID	
	Teor (%)	DPR (%)
Teste S	98,9	0,08
Teste T	99,5	0,16
Teste U	98,7	0,22
Teste V	100,7	0,33
Teste W	99,8	0,13
Teste X	99,2	0,48
Teste Y	99,4	0,10
Teste Z	99,9	0,37
Média (%)	99,5	
DP (%)	0,61	
DPR (%) entre amostras	0,62	

DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama.

A Tabela XXIV e a Figura 20 ilustram os efeitos dos fatores entre os dois níveis, indicando que não há efeito significativo entre eles. Para a construção do gráfico de Pareto foi utilizado software de estatística Minitab 2007⁶². O gráfico de Pareto é a plotagem dos valores obtidos para os efeitos da variação de cada fator,

apresentando um E (efeito) crítico numa linha vertical, de forma que se possa visualizar qual fator apresenta um efeito significativo⁴³.

Tabela XXIV: Resultados dos efeitos do teste de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de Simeticona emulsão 30% por cromatografia gasosa.

Efeitos	Média nível alto	Média nível baixo	Efeito
Aa	99,5	99,6	-0,12
Bb	99,4	99,7	-0,32
Cc	99,2	99,8	-0,59
Dd	99,4	99,6	-0,15
Ee	99,2	99,8	-0,65
Ff	99,8	99,2	0,64

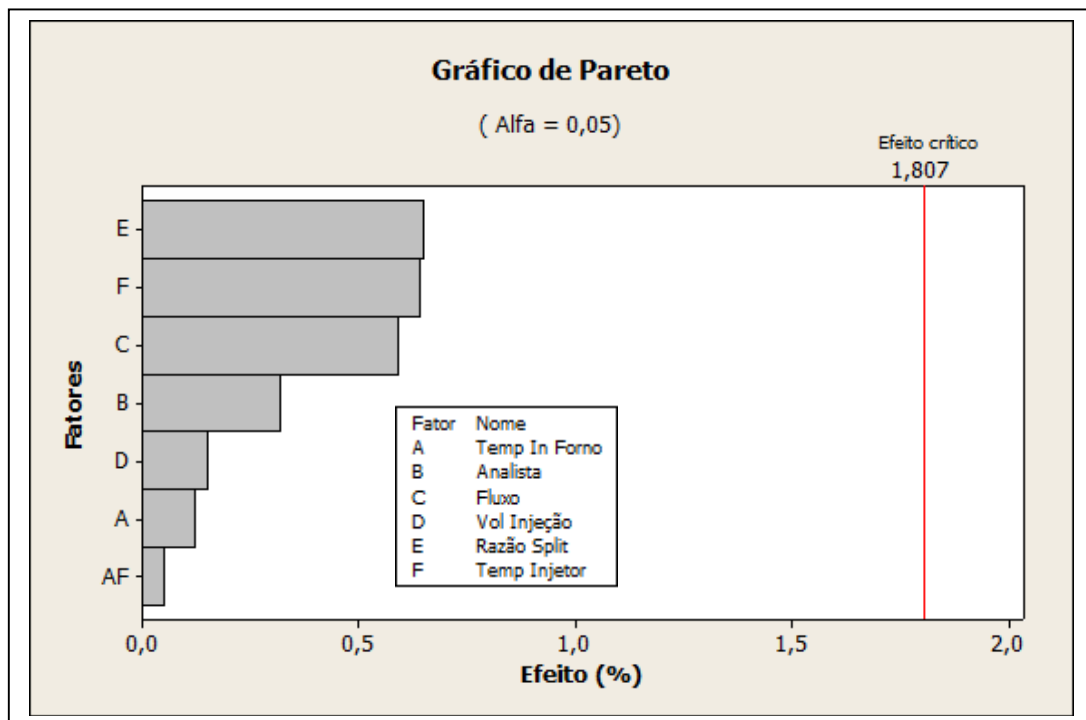


Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%, construído pelo software Minitab 2007⁶².

Para o método de infravermelho, a robustez foi testada com três fatores e dois níveis, com planejamento experimental aleatório e seis realizações de análise⁶³. A

Tabela XXV apresenta os fatores e níveis utilizados. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela XXVI, sendo que o desvio-padrão relativo entre as medidas ficou dentro do critério de aceitação desse parâmetro.

Tabela XXV: Fatores testados na robustez do método de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%.

Fatores	Nível Alto	Nível baixo
Número de Scans	32	16
Marca Solvente	X	Y
Temperatura Ambiente	25	20

Para verificação do efeito da variação dos fatores, usou-se o *software* Minitab⁶² para cálculo dos efeitos e geração do gráfico de Pareto,⁴³ (Figura 21). Pode-se observar que o maior efeito é da variação do número de scans durante a leitura do espectro. Contudo, nenhum efeito é maior do que o efeito crítico, em nível de confiança de 95%, ou seja, o efeito entre os fatores não é significativo.

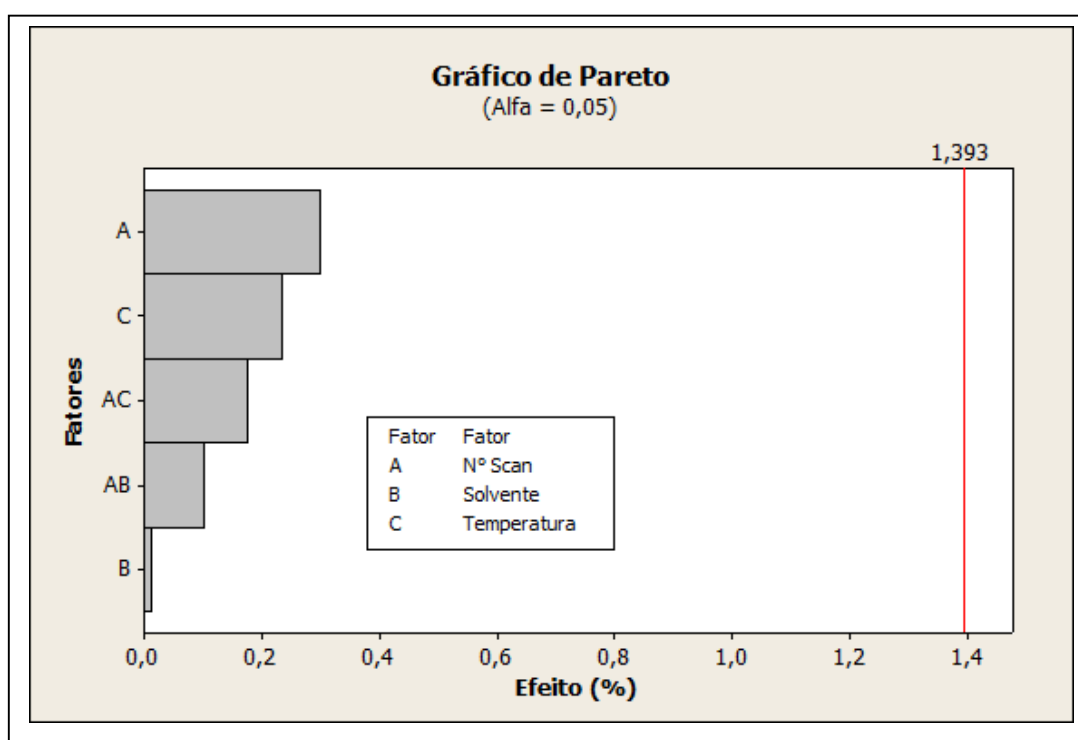


Figura 21: Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 30%, construído pelo *software* Minitab 2007⁶².

Tabela XXVI: Resultados dos testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em Simeticona emulsão por espectrofotometria de infravermelho.

Planejamento Aleatório			Análise	Recuperação FTIR	
N° Scans	Solvente	Temperatura		Teor (%)	DPR (%)
16	X	20	Análise 1	103,1	0,04
16	X	25	Análise 2	103,2	0,05
32	Y	20	Análise 3	103,2	0,05
32	X	25	Análise 4	103,5	0,05
16	Y	25	Análise 5	103,0	0,04
32	X	20	Análise 6	103,1	0,04
Média (%)				103,2	
DP (%)				0,17	
DPR (%) entre amostras				0,17	

DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

5.3.1.6 Comparação entre Método Cromatográfico e Espectrométrico

A comparação dos métodos foi realizada com o auxílio estatístico do teste-F, que compara as variâncias do parâmetro de repetibilidade, utilizando a hipótese nula de que os dois métodos são igualmente precisos. A equação-12, usada para esse teste, coloca o resultado de maior variância no numerador e a menor variância no denominador, utilizando 5 graus de liberdade para ambos se tem o $F_{\text{crítico}}$ para 95% de confiança igual a 5,050. O valor de F encontrado para os dois métodos foi de 27,115, indicando que os métodos não são igualmente precisos.

$$F = \frac{V1}{V2} \quad (\text{equação-12})$$

Onde:

V1=variância do método de FTIR;

V2=variância do método de GC;

Para verificar se as médias dos resultados do teste de repetibilidade, dos métodos cromatográfico e espectrométrico, podem ser consideradas iguais empregou-se o teste t-Student para comparação de médias de variâncias diferentes.

O resultado do t calculado foi de 3,188, e o t tabelado para um nível de 98% de confiança é 3,36, aceitando-se assim a hipótese nula de que os resultados das médias dos dois métodos em estudo são iguais.

5.3.2 Simeticona 100%

5.3.2.1 Especificidade/Seletividade

Para a matéria-prima de simeticona 100%, a especificidade para o método cromatográfico foi comprovada pela inexistência de picos no tempo de retenção da dimeticona, e para o método por infravermelho, pela ausência de absorção na região da dimeticona (entre 1309 e 1209 cm^{-1}).

A seguir, as Figuras 22 a 25 apresentam os cromatogramas e espectros do padrão de concentração 100% do alvo estipulado e da amostra Branco (hexano), solvente utilizado na análise.

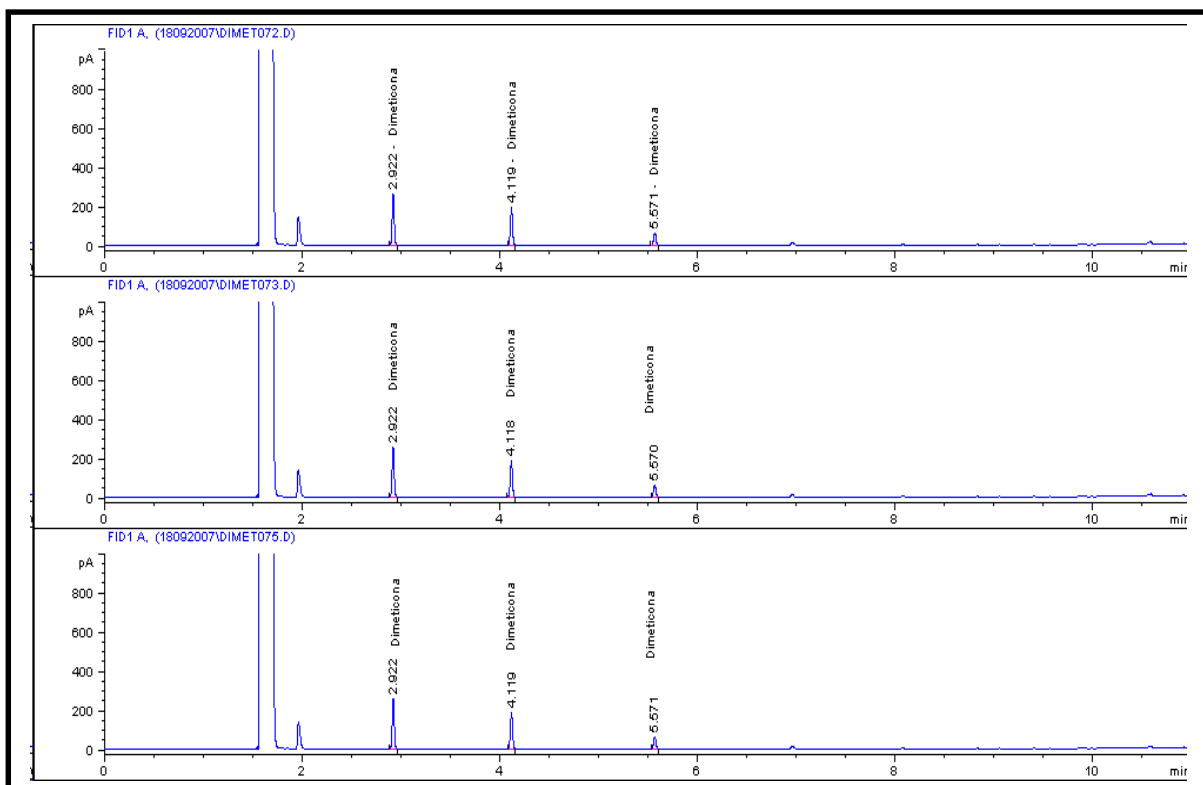


Figura 22: Cromatogramas das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por cromatografia gasosa para matéria-prima de simeticona 100%

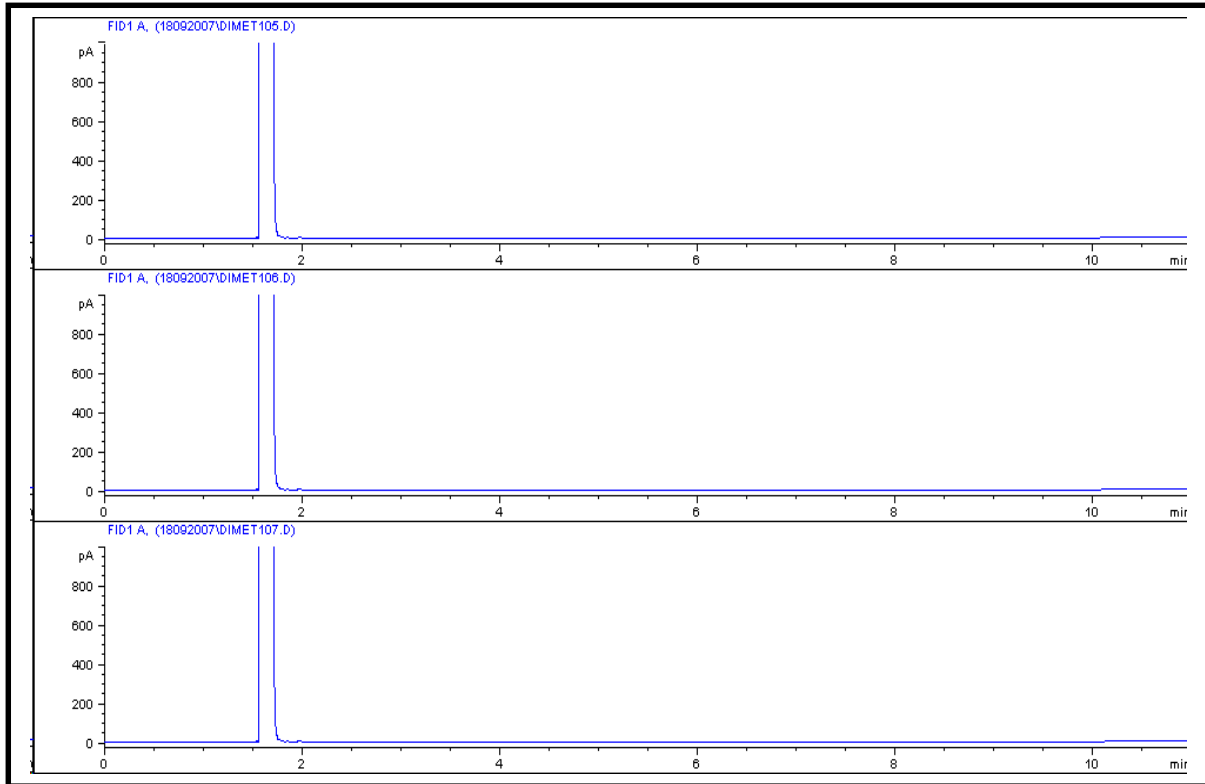


Figura 23: Cromatogramas das triplicatas da amostra Branco (hexano) por cromatografia gasosa para a matéria-prima de Simeticona 100%

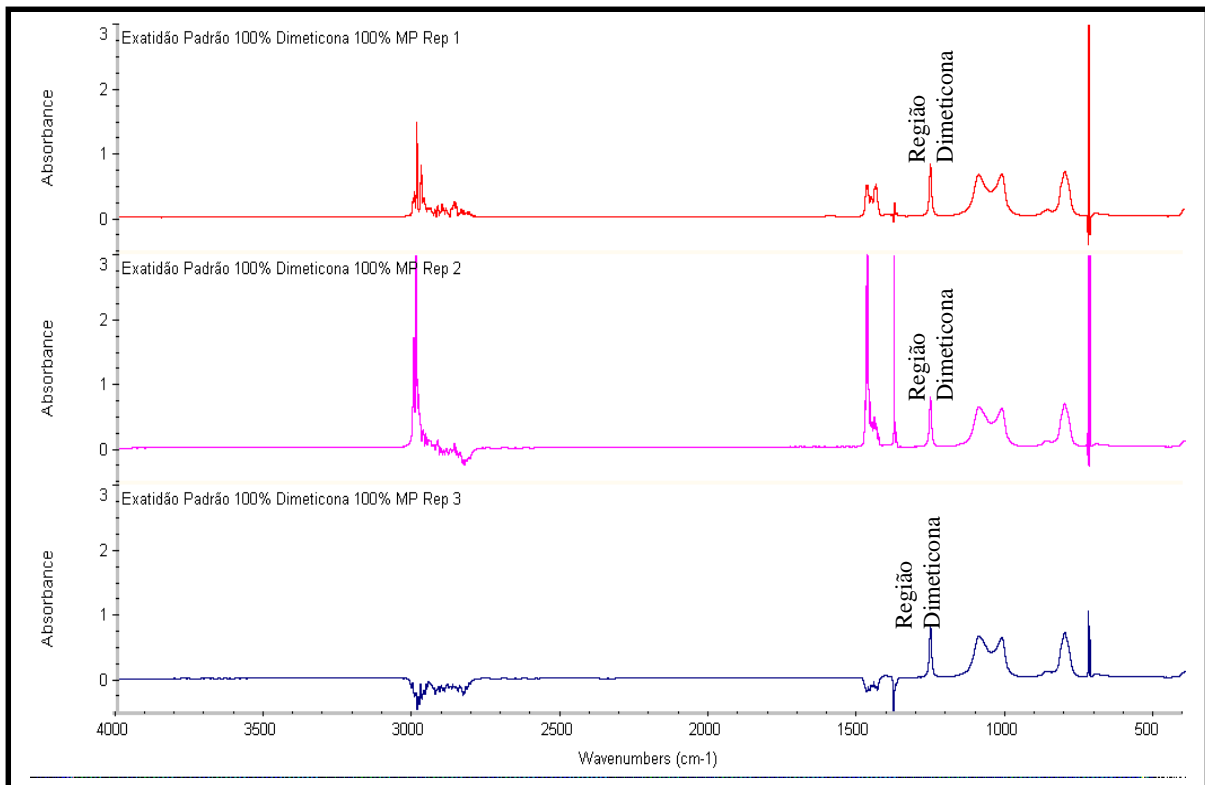


Figura 24: Espectros das triplicatas do padrão de referência de dimeticona por método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona 100%.

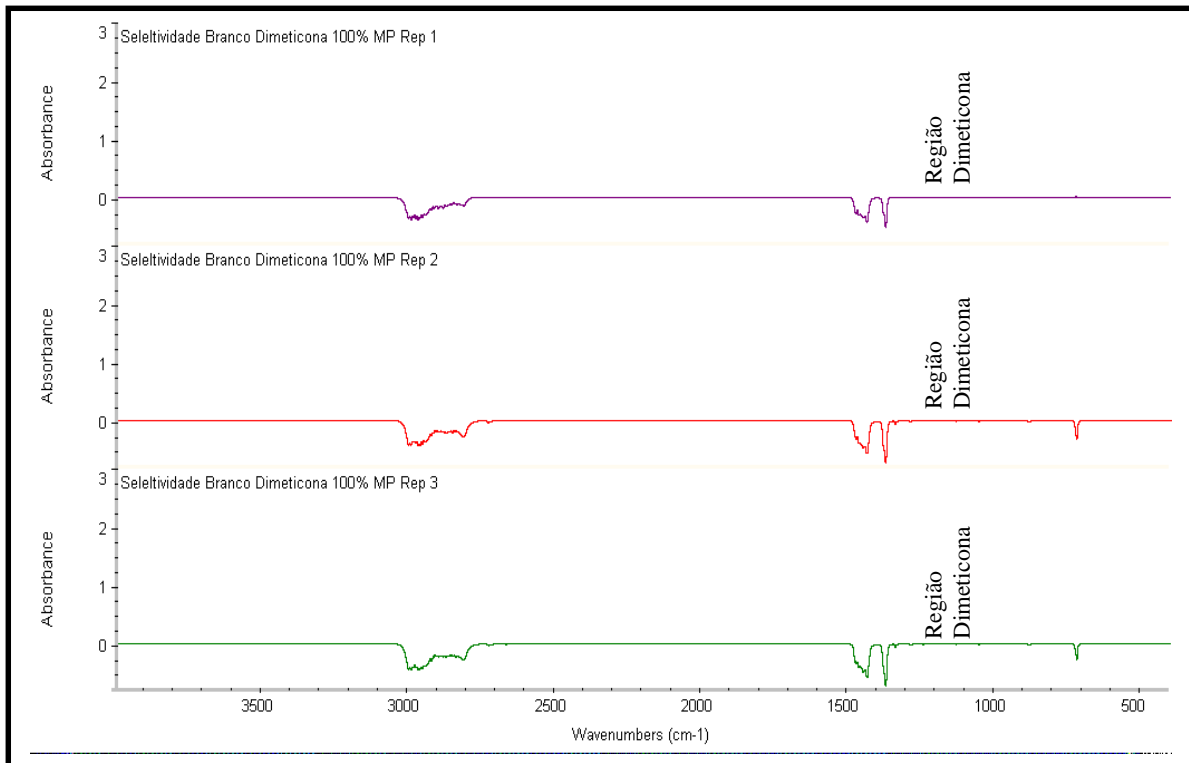


Figura 25: Espectros das triplicatas da amostra Branco (hexano) por método de infravermelho para a matéria-prima de simeticona 100%.

5.3.2.2 Linearidade e Intervalo

A Tabela XXVII apresenta os resultados das áreas dos sinais cromatográficos (GC) e por infravermelho (FTIR) para a série de sete padrões sintéticos avaliados.

Tabela XXVII: Linearidade e Intervalo dos métodos de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100%.

Padrão (Dimeticona)	Intervalo (%)	Concentração calculada(mg.mL ⁻¹)	Área GC (u.a)	Área FTIR (u.a)
1	50	1,50	407,4740	4,8054
2	80	2,42	646,2580	7,7349
3	90	2,72	730,2566	8,8473
4	100	3,02	783,4050	9,2483
5	110	3,35	852,8111	10,7089
6	120	3,66	938,9191	10,8822
7	150	4,56	1163,5639	14,4884

GC: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

A Tabela XXVIII e a Figura 26 apresentam os resultados da regressão linear dos métodos em estudo. Avaliando as linearidades das curvas obtidas, pode-se concluir que o método cromatográfico demonstrou melhor correlação entre a

concentração dos padrões e o sinal gerado no equipamento. Os dois coeficientes de correlação estimados estão acima do critério de aceitação.

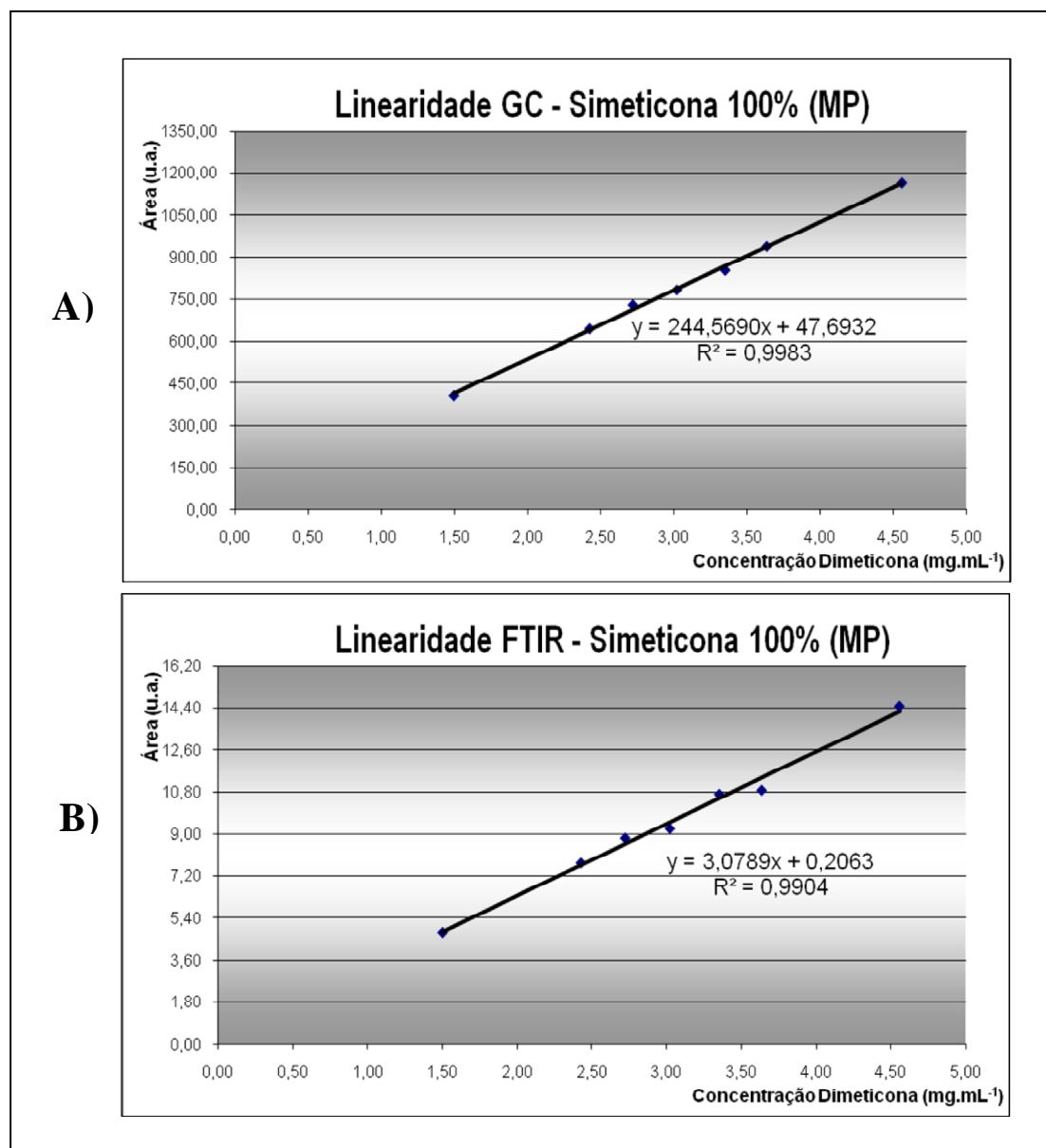


Figura 26: Curvas de linearidade do método de quantificação de dimeticona em simeticona 100%: A) cromatografia gasosa B) espectroscopia de infravermelho.

Tabela XXVIII: Resumo de resultados da regressão linear dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

Método	Coefficiente angular (a)	Coefficiente de linearidade (b)	Equação	Coefficiente de correlação linear (r ²)
GC-FID	244,57	47,69	Y=244,57+47,69	0,9983
FTIR	3,08	0,18	Y=3,08X+0,18	0,9906

*Y se refere à área medida e o X se refere à concentração de dimeticona em mg.mL⁻¹; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Assim como na avaliação dos métodos para simeticona emulsão 30%, os métodos para simeticona 100% foram verificados para a validade da regressão, utilizando o teste estatístico de regressão pela ANOVA, com auxílio de *software* Excel for Windows, descritos na Tabela XXIX.

Tabela XXIX: Resumo de resultados da ANOVA dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

Método	Fonte de Variação	Graus de liberdade (v)	Soma dos quadrados (SQ)	Média Quadrática (MQ)	F
GC-FID	Regressão	1	1007058	1007058	10351,66
	Resíduo	19	1848,408	97,28464	
	Total	20	1008906		
FTIR	Regressão	1	159,5994	159,5994	1967,808
	Resíduo	19	1,540998	0,08110520	
	Total	20	161,1404		

GC: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; F: razão entre MQ da regressão e o MQ do resíduo.

Os valores de F encontrados para a regressão dos dois métodos foram muito maiores do que $F_{\text{crítico } 5\%(1,19)}=4,381$, indicando que a inclinação da reta, ao nível de confiança de 95% é diferente de zero, ou seja há inclinação, há regressão.

Para se verificar se existem dados discrepantes para a curva de linearidade dos métodos de quantificação de dimeticona para a matéria-prima de simeticona 100% foi utilizado o teste estatístico de Grubbs, onde se calculam o G máximo e o G mínimo, a partir da média e do desvio-padrão das áreas obtidas para todos os níveis de concentração. A Tabela XXX traz os resultados dessa parte do estudo. Observa-se que tanto o G máximo e o G mínimo estão abaixo do G crítico, indicando, assim que não existem dados discrepantes.⁵⁶

Tabela XXX: Resumo de resultados do teste de Grubbs dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

Método	Média Geral	DP Geral	G Mín	G Máx	G Crítico
GC-FID	788,96	224,60	1,705	1,687	2,557
FTIR	9,530	2,843	1,664	1,744	2,557

DP:desvio-padrão; GMin:valor mínimo de Grubbs; GMáx: valor máximo de Grubbs; Gcrítico: valor tabelado de Grubbs para 21 graus de liberdade. GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Para verificar a homogeneidade dos resultados obtidos, aplicou-se o teste Bartlett e Cochran. Contudo, antes disso foi preciso verificar, com o auxílio do *software* ASSISTAT ⁵⁷ a normalidade dos resultados obtidos. Aplicou-se o método de Anderson-Darling e Shapiro-Wilk, resultando a distribuição como normal.

Tabela XXXI: Resumo de resultados do teste Bartlett dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

Método	χ^2 Calculado	χ^2 tabelado α 5%	Homogêneo
GC-FID	4,909	12,592	sim
FTIR	10,010	12,592	sim

GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Tabela XXXII: Resumo de resultados do teste Cochran dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona emulsão 100%.

Método	Padrão	50%	80%	90%	100%	110%	120%	150%
GC-FID	Área 1	408,29	649,89	731,44	785,46	849,91	937,52	1.164,18
	Área 2	406,10	644,57	730,84	779,57	854,47	938,95	1.158,58
	Área 3	408,04	644,31	728,49	785,19	854,05	940,29	1.167,94
	Média	407,47	646,26	730,26	783,41	852,81	938,92	1.163,56
	DP	1,20	3,15	1,56	3,32	2,52	1,38	4,71
	V	1,44	9,91	2,44	11,03	6,34	1,91	22,20
	DPR	0,29	0,49	0,21	0,42	0,29	0,15	0,40
$\Sigma V=55,26$ $C_{cal}=0,4017$ $C_{tab 1\%}=0,6644$								
FTIR	Área 1	4,7993	7,7821	8,8431	9,2563	10,706	10,885	14,486
	Área 2	4,8065	7,7889	8,8495	9,2480	10,710	10,867	14,489
	Área 3	4,8104	7,7863	8,8493	9,2405	10,711	10,895	14,490
	Média	4,8054	7,7858	8,8473	9,2483	10,709	10,882	14,488
	DP	5,63E-03	3,43E-03	3,64E-03	7,90E-03	2,42E-03	1,44E-02	2,01E-03
	V	3,17E-05	1,18E-05	1,32E-05	6,25E-05	5,85E-06	2,06E-04	4,03E-06
	DPR	1,17E-01	4,41E-02	4,11E-02	8,55E-02	2,26E-02	1,32E-01	1,39E-02

$\Sigma V=3,356E-04$ $C_{cal}=0,6154$ $C_{tab 1\%}=0,6644$

DP=desvio-padrão; V=variância; DPR=desvio-padrão relativo; ΣV =soma da variância; C_{cal} =valor de Cochran calculado; $C_{tab 5\%}$ =valor tabelado de Cochran com 95% de confiança. GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

O teste de Bartlett analisa a variância entre os níveis de concentração, e os resultados obtidos (Tabela XXXI) mostram que o valor de χ^2 calculado é menor do o

valor χ^2 tabelado, indicando que a hipótese nula de homogeneidade pode ser aceita.

A partir do teste de Cochran pode-se também fazer a análise de homoscedasticidade da linearidade, ou seja, verificar se a faixa escolhida para a curva é homogênea. A Tabela XXXII mostra os resultados encontrados e o nível de significância utilizado para esse caso foi de 1%. O valor de C tabelado para sete variâncias comparadas para três replicatas é 0,6644, sendo esse maior que os C calculados para a faixa de linearidade utilizada em cada método.

5.3.2.3 Exatidão

Tabela XXXIII. Resumo da Exatidão e Precisão Intermediária dos métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

	EXATIDÃO					PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
	Dia	Amostra	Rec (%)	DPR _{TRI} (%)	ER (%)	Média _{ED} (%)	DP _{ED} (%)	DPR _{ED} (%)	Teste t-Student 1%
GC-FID	1	50	99,0	0,30	-0,95	100,2	0,99	0,98	0,306
	2	50	100,9	0,25	0,90				
	3	50	100,6	0,63	0,57				
	1	100	101,2	0,18	1,18	100,7	0,41	0,40	3,097
	2	100	100,6	0,23	0,59				
	3	100	100,4	0,29	0,40				
	1	150	99,8	0,27	-0,22	100,0	0,55	0,55	-0,0513
	2	150	99,6	0,21	-0,43				
	3	150	100,6	0,54	0,60				
FTIR	1	50	103,8	0,10	3,77	102,4	2,02	1,98	2,078
	2	50	103,4	0,11	3,41				
	3	50	100,1	1,4	0,10				
	1	100	100,9	0,07	0,88	100,5	1,99	1,98	0,457
	2	100	98,4	0,06	-1,62				
	3	100	102,3	0,46	2,31				
	1	150	97,4	0,05	-2,56	98,4	3,88	3,94	-0,721
	2	150	102,6	0,04	2,65				
	3	150	95,1	0,15	-4,93				

Rec = percentual de recuperação do analito adicionado; ER = erro relativo; DPR_{TRI}= desvio padrão relativo entre as triplicatas; DP_{ED} = desvio-padrão entre dias; DPR_{ED}=Desvio-padrão relativo entre dias; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

A exatidão foi avaliada com as mesmas equações 8 e 9 dos métodos de simeticona emulsão 30%, para cálculo do teor recuperação do analito adicionado e para o erro relativo. A Tabela XXXIII apresenta os resultados obtidos para o parâmetro de exatidão, ficando a variação de recuperação do analito adicionado para o método cromatográfico entre 99,05% e 101,18%, enquanto que para o método espectroscópico, entre 95,07% e 103,77%, mostrando uma faixa de exatidão mais estreita para o primeiro método avaliado. O desvio-padrão relativo entre as triplicatas foi inferior a 1,4%, concluindo-se que todos os parâmetros avaliados estão dentro do critério de aceitação estipulado no item 4.3.6.

5.3.2.4 Precisão

5.3.2.4.1 Precisão Intermediária

A Tabela XXXIII traz os resultados da precisão intermediária, juntamente com a exatidão. Isso é devido ao fato da precisão de ter sido calculada a partir dos dados da exatidão, que foi realizada em três dias diferentes nos três níveis de concentração considerados (baixo, médio e alto). Para avaliação desse parâmetro foi utilizado o desvio-padrão relativo entre dias, a média entre dias, nos quais ambos cumprem o critério de aceitação.

Foi realizado o teste t-Student em cada nível de concentração e os valores calculados encontram-se descritos na Tabela XXXIII. Todos os valores ficaram abaixo do valor tabelado de t para 95% de confiança, com dois graus de liberdade e n igual a 3, aceitando-se assim, a hipótese de que a média obtida entre os níveis pode ser considerada igual a 100%.

O valor encontrado de desvio-padrão relativo com a equação de Horwitz foi de 4,75 para a precisão intermediária⁵⁸. Os valores encontrados de desvio-padrão relativo das análises das amostras entre dias foram inferiores a esse valor.

5.3.2.4.2 Repetibilidade

Os resultados do elemento de validação de repetibilidade (Tabela XXXIV) estão todos dentro do critério de aceitação do estudo. A equação de Horwitz^{58,59,60}, também pode ser usada para avaliação e o valor encontrado foi de 3,166, ficando

assim o método de espectroscopia de infravermelho fora desse critério. Como já foi comentado anteriormente, mesmo não estando dentro do critério da Comissão Européia, esse parâmetro ainda se encontra dentro do parâmetro da legislação brasileira vigente, Resolução 899, ANVISA ²⁵.

Para avaliar se as médias obtidas das recuperações de analito adicionada em cada método podem ser iguais a 100%, utilizou-se o teste t-Student, com cinco graus de liberdade, com n igual a 6 e 99% de confiança. O valor de t calculado para o método cromatográfico foi de -3,889 e para o método de infravermelho de -0,556, sendo ambos menores do que o valor de t tabelado, indicando que a hipótese nula de igualdade pode ser aceita.

Tabela XXXIV: Repetibilidade do método de quantificação de dimeticona em simeticona 100%

Amostras 100 %	Recuperação GC-FID		Recuperação FTIR	
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
Amostra A	99,6	0,52	99,4	0,71
Amostra B	99,9	0,23	98,9	2,41
Amostra C	99,4	0,40	97,9	0,37
Amostra D	98,7	0,54	93,7	0,31
Amostra E	99,2	0,96	102,4	1,35
Amostra F	99,5	1,05	103,0	0,73
Média (%)	99,4		99,24	
DP (%)	0,39		3,35	
DPR (%) entre amostras	0,39		3,38	
Teste t-Student 5%	-3,889		-0,556	
t-Student crítico (0,01,5) bicaudal	4,032		4,032	
CV Horwitz calculado (%)	3,166		3,166	

GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão; EA: entre amostras; CV: coeficiente de variação.

5.3.2.5 Robustez

Da mesma forma que ocorreu com o parâmetro de robustez dos dois métodos anteriormente apresentados para simeticona emulsão 30%, os métodos para a simeticona 100% foram avaliados, com o auxílio do plano de Youden³¹. A Tabela XXXV apresenta os valores de recuperação do analito adicionado, juntamente com os seus cálculos de desvio-padrão relativo e média entre os oito testes realizados.

Para verificar os efeitos sobre os níveis dos fatores avaliados (vide Tabela XII, item 4.3.5, onde se variou temperatura inicial do forno, analista, fluxo do gás de arraste, volume de injeção de amostra, razão de divisão de amostra e temperatura do injetor), fez-se uso do *software* Minitab 2007⁶². Os resultados gerados pelo *software* estão expostos na Tabela XXXVI e na Figura 27. Pelo gráfico de Pareto pode-se observar que os efeitos calculados são menores do que o efeito crítico, indicando que não há interação significativa entre os fatores, a um nível de confiança de 95%.

Tabela XXXV: Resultados dos testes de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona 100%.

Experimento	Recuperação GC-FID	
	Teor (%)	DPR (%)
Teste S	98,5	0,46
Teste T	98,3	0,20
Teste U	99,2	0,21
Teste V	99,5	0,33
Teste W	100,7	0,27
Teste X	98,6	0,17
Teste Y	100,1	0,35
Teste Z	99,2	0,06
Média (%)	99,3	
DP (%)	0,82	
DPR (%) entre amostras	0,83	

DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão; GC-FID: cromatografia gasosa com ionização de chama.

Tabela XXXVI: Resultados dos efeitos do teste de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100% por cromatografia gasosa.

Efeitos	Média nível alto	Média nível baixo	Efeito
Aa	98,9	99,6	-0,74
Bb	99,0	99,5	-0,46
Cc	99,6	98,9	0,76
Dd	99,0	99,5	-0,46
Ee	98,9	99,7	-0,78
Ff	99,5	99,1	0,40

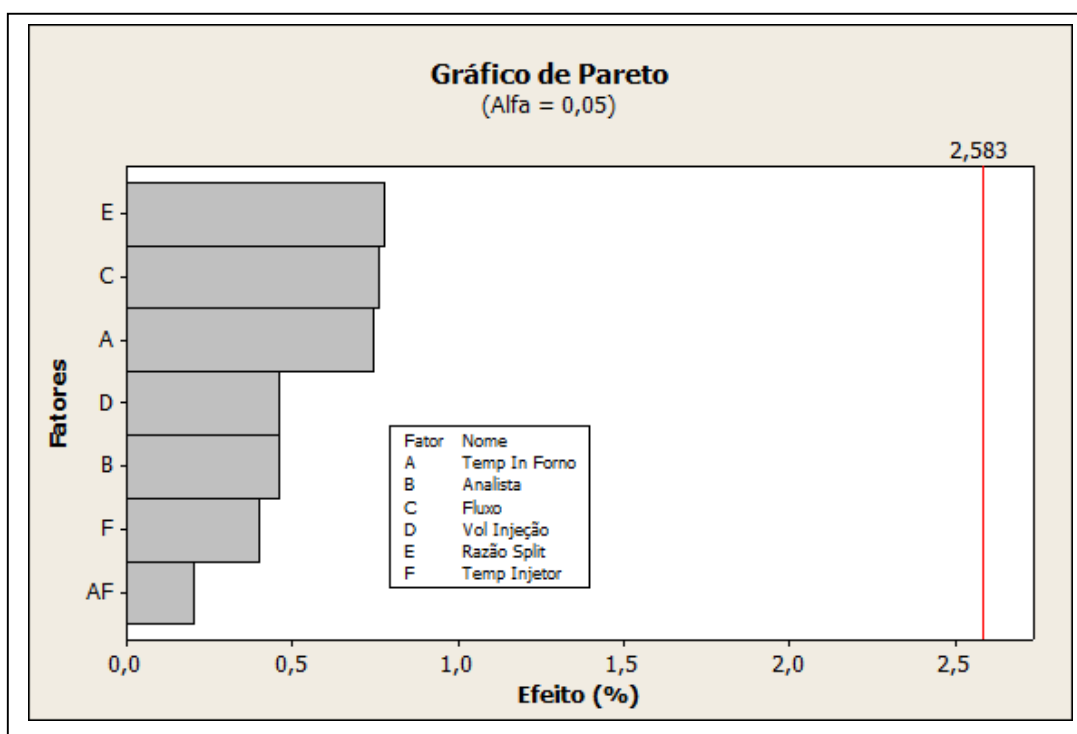


Figura 27: Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método cromatográfico de quantificação de dimeticona em simeticona 100%, construído pelo software Minitab 2007⁶².

Para a espectroscopia de infravermelho, a robustez foi avaliada somente com dois fatores e dois níveis, com quatro realizações de análise. Os fatores e níveis realizados foram aqueles apresentados na Tabela XXXVII, e a planilha de testes e seus resultados estão na Tabela XXXVIII. Com o auxílio do software Minitab 2007⁶² calculou-se os efeitos e construiu-se o gráfico de Pareto (Figura 28). A partir desses elementos verificou-se que as interações entre os fatores não são significativas com alfa 0,05.

Tabela XXXVII: Fatores testados na robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100%.

Fatores	Nível alto	Nível baixo
Número de Scans	32	16
Marca Solvente	X	Y

Tabela XXXVIII: Resultados dos testes de robustez do método de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona 100% por espectrofotometria de infravermelho.

Planejamento Aleatório		Experimento	Recuperação FTIR	
Nº Scans	Solvente		Teor (%)	DPR (%)
16	X	Análise 1	100,0	0,23
32	Y	Análise 2	103,6	0,39
32	X	Análise 3	101,8	0,24
16	Y	Análise 4	101,7	0,10
Média (%)			101,8	
DP (%)			1,44	
DPR (%) entre amostras			1,42	

DPR: desvio-padrão relativo; DP: desvio-padrão FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

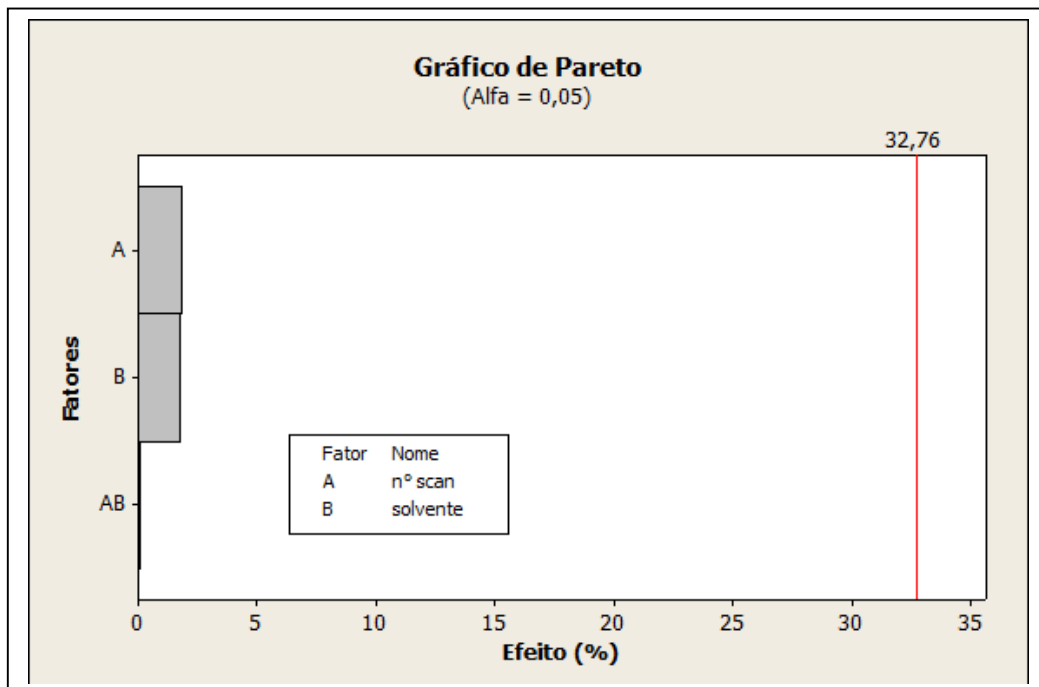


Figura 28: Gráfico de Pareto dos efeitos do teste de robustez do método de espectroscopia de infravermelho para quantificação de dimeticona em simeticona 100%, construído pelo software Minitab 2007⁶².

5.3.2.6 Comparação entre Método Cromatográfico e Espectrométrico

Foi empregado, para comparação dos dois métodos de quantificação de dimeticona em simeticona 100%, o teste F de comparação de variâncias. O valor encontrado foi igual a 75,645, ou seja, muito maior que o valor tabelado de F para nível de significância de 5%, para 5 graus de liberdade para a maior e menor variância, que é 5,050. Então, considera-se que a hipótese nula das variâncias iguais é rejeitada, ou seja, os métodos não são igualmente precisos.

Na aplicação do teste t-Student para verificar se as médias dos métodos em estudo para simeticona 100% são iguais, verificou-se que o valor de t calculado de 0,109 é menor do que o valor de t tabelado (2,570), ao nível de 95% de confiança, com cinco graus de liberdade e n igual a seis. Pode-se concluir nesse teste que as médias podem ser consideradas iguais.

5.4 Análise de Amostras Reais

Para avaliar os testes desenvolvidos e validados de cromatografia gasosa com ionização de chama para quantificação de dimeticona em matéria-prima simeticona emulsão 30% e simeticona 100% foram realizadas algumas análises de amostras retidas como contra-prova (retém).

Observando a Tabela XXXIX conclui-se que os resultados obtidos pelo método cromatográfico são válidos. Essa decisão foi tomada a partir da aplicação do teste t-Student para verificar se o teor, das matérias-primas analisadas, comparado com o resultado do certificado de análise do fornecedor Dow Corning do respectivo lote, pode ser considerado igual. O valor de t tabelado para essa avaliação estatística, com 99% de confiança, com dois graus de liberdade, foi de 9,92.

Tabela XXXIX: Resultados de amostras analisadas com os métodos validados de quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama.

Amostras	Teor (%)	DPR%	Teor (%) DC	t-Student
Lote 10085	101,4	3,30	93,2	4,253
Lote 10085	98,0	1,89	93,2	4,489
Lote 17984	99,7	1,06	91,4	7,906
Lote 19900	90,3	0,79	93,7	7,329

DPR%: desvio-padrão relativo em percentual; DC: teor de análise em certificado de análise do fornecedor Dow Corning.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

As análises qualitativas das matérias-primas de simeticona por espectroscopia no infravermelho próximo, cromatografia de permeação de gel e espectrometria de massa foram de grande utilidade para a caracterização, lembrando que dentro da indústria farmacêutica a qualificação da matéria-prima é ponto fundamental no controle de qualidade.

Os métodos de quantificação, de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama e por espectroscopia de absorção molecular no infravermelho, validados, cumpriram os critérios de aceitação estipulados no início do estudo, sendo que a aplicação estatística dentro dos parâmetros de validação auxiliou de forma significativa, a tomada de decisão, aumentando a confiabilidade dos métodos em desenvolvimento.

A comparação realizada dos métodos validados com os métodos baseados na farmacopéia americana para o teste de igualdade de variâncias mostrou que eles não são igualmente precisos. Contudo, isso não invalida a utilidade dos métodos cromatográficos, somente sugere que a precisão entre eles é diferente. Na comparação entre os métodos, o teste t-Student utilizado indicou que os valores encontrados na repetibilidade podem ser considerados iguais.

Enfim, os métodos desenvolvidos para quantificação de dimeticona em matéria-prima de simeticona emulsão 30% e simeticona 100% podem ser considerados validados. Isso significa que eles são adequados para a finalidade a qual se propõem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. USP U.S. Pharmacopeia 29, 2006, (U.S. Pharmacopeia Convention, Rockville, Maryland).
2. Colas, A., Rafidison, P., *PharmaChem*, 2005, 46-49, p. 45-49.
3. Elschenbroich, C., Salzer, A., *Organometallics*. 2 ed. Weinheim: Wiley, 1992.
4. P. Somasundaran, Mehta, S. C., Purohit, P., *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, 128-130, p.103-109.
5. Becher, P., *Emulsion theory and practice*, 2. ed., New York: Reinhold, 1965.
6. Torrado, G., Garcia-Arieta, A., Rios, F. de los, J.C. Menéndez, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 19, p. 285-292.
7. Site Dow Corning. Products Finder. Antifoam A Compound. Antifoam C Emulsion. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/applications/search/default.aspx?R=114EN>, acessado em 19 de dezembro de 2007.
8. Site de Paulo Rogério Veiga Silva, especialista em NIRS. Introdução teórica de infravermelho. Disponível em: <http://www.angelfire.com/ab/prvs/infrav.html>, acessado em 28 de Janeiro de 2008.
9. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5. ed., Porto Alegre: Bookman, 2008.
10. Arnold, S. A., Harvey, L. M., McNeil, B., and Hall, J. W., *BioPharm International*, 2002, p. 26-34
11. Broad, N., Graham, P., Hailey, P., Hardy, A., Holland, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N., Warren, P., *Guidelines for the Development and Validation of Near-Infrared Spectroscopic Methods in the Pharmaceutical Industry*, Chichester: Wiley, 2002.
12. Silverstein, R. M., *Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos*, 6. ed., John Wiley & Sons Ltd, 2000.

13. Cienfuegos, F., *Química e Derivados*, Espectroscopia de absorção de IV por Transformada de Fourier, 2004, dez/jan, p.30-38.
14. Site para pesquisa livre de espectroscopia spectroscopyNOW. Disponível em: <http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=18427&type=EducationFeature&chld=2&page=1>, acessado em 19 de maio de 2008.
15. Moore, D. E., Liu, T. X., Miao, W. G., Edwards, A., Elliss, R., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30, p. 273-278.
16. Andersson, S., Hedsten, U., Jacobssen, S., *Journal of Chromatography A*, 1989, 477, p. 474-476.
17. Dorn, S. B., Frame, E. M. S., *Analyst*, 1994, vol. 119, p. 1687-1694.
18. Mojsiewicz, K., Peinkowska, *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, p.7-12.
19. Liu, X. M., Maziarz, E. P., Heiler, D. J., Grobe, G. L., *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14, p.195-202.
20. Liu, X. M., Maziarz, E. P., Heiler, D. J., *Journal of Chromatography A*, 2004, 1034, p.125-131.
21. Lakits, A., Nennadal, T., Scholda, C., Knaus, S., Gruber, H., *Ophthalmology*, 1999, 106, p.1091-1100.
22. M. Barrère, F. Ganachaud, D. Bendejacq, M. A. Dourges, C. Maitre, P. Hérmery, *Polymer*, 2001, 42, p. 7239-7246.
23. Carmichael, J.B., Gordon, D. J., Ferguson, C.E., *Journal Gas Chromatography*, 1966, 4, p.347-349.
24. NBR ISO/IEC 17025, Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaio, ABNT, Brasil, 2001.
25. Resolução – RE nº 899, ANVISA, Legislação em Vigilância Sanitária, ANEXO Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 2003.
26. Eurachem Working Group, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

27. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Thirty-second report, WHO Technical Report Series, Nº823, Geneva, 1992.
28. Fonseca, S. S. G. C., Silva, L. B. L. da, Castro, R. F. e Santana, D. P., *Química Nova*, 2004, v. 27, nº1, p. 157-159.
29. Valentini, S. R., Sommer, W.A., Matioli, G., *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 2004 v. 26, n. 2, p. 357-364.
30. Hájková, R., Sklenářová, H., Matysová, L., Švecová, P., Petr Solich, *Talanta*, 2007, 73, p. 483–489.
31. INMETRO, DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validações de Métodos de Ensaio Químicos, Rj, Brasil, revisão junho 2007.
32. United States Food and Drug Administration (US-FDA), Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.
33. United States Food and Drug Administration (US-FDA), Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds, 1995.
34. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Q2(R1), 2005.
35. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Peer verified method program: manual on policies and procedures. Arlington, VA, 1993.
36. Freitas, S. M. Metodologia Estatística para Validação de Métodos Analíticos Aplicável a Metrologia em Química, 2003. 106 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade Industrial, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2003.
37. Brito, N.M., Amarante O.P., Polese, J. L., M.L. Ribeiro, *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, 2003, v.13, p. 129-146.
38. Chui, Q. S. H. , Zucchini, R. R. , Lichtig, J. *Química Nova*, 2001, v. 24, p. 374-380.

39. United States Food and Drug Administration (US-FDA), Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.
40. United States Food and Drug Administration (US-FDA), Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1999.
41. Dejaegher, B. , Heyden, Y. V. , Screening Design (Part I) – Types and Properties, outubro, 2001.
42. Heyden, Y.V., Luypaert, K., Hartmann, C., Massart, D.L., Hoogmartens, J., Beer, J. De, *Analytica Chimica Acta*, 1995, 312, p. 245-262.
43. Dejaegher, B., Heyden, Y. V, Screening Designs (Part 2) Data Analysis, *LCGC Europe*, fevereiro, 2008.
44. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), Principles of Good Laboratory Practice, Paris, 1998.
45. INMETRO, NORMA NIT-DICLA-035, Requisitos Gerais para Laboratórios segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL, Revisão 00, dezembro 2007.
46. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). AppendixG, Checklist for Protocol Design of Collaborative Studies: Quantitative Methods, 2000.
47. Bruce, P., Minkkinen, P., Rickkola, M. L. , *Mikrochimica Acta*, 1998, 128, p. 93-106.
- 48 ISO 78/2 1ªed, Layout for Standards – Part 2 Standard for Chemical Analysis International Standard, 1982.
49. Taverniers, I., Loose, M. D., Bockstaele, E. V., *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, p.535-552.
50. Mesley, R. J., Pocklington, W. D. Walker, R. F., *Analyst*, 1991, vol 116, p. 975-990.
51. Resolução – RE nº 210, ANVISA, Legislação em Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, 2003.

52. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods, 2002.
53. United States Food and Drug Administration (US-FDA), Guideline on General Principles of Process Validation, 1987.
54. Box, G.E.P., Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building. New York, John Wiley, 1978.
55. Rohlf, F. J. & Sokal, RR., Statistical Tables, 2^a ed., USA, 1981.
56. Neto, B.de B., Pimentel, M.F., Araújo, M.C.U., *Química Nova*, 2002, v. 25, p.856-865.
57. Software Assitat download da página <http://freestatistics.altervista.org/en/stat.php> em abril de 2008.
58. Official Journal of the European Communities, Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, 2002, L 221.
59. Site da Royal Society of Chemistry. Livros gratuitos. Disponível em: <http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/BK9780854044825/BK9780854044825-00001.pdf>, acessado em junho de 2008
60. Wood, R., *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, v. 18, p. 624-632.
61. Burke, S., Understanding the Structure of Scientific Data, *LCGC Europe Online Supplement*, 2001, p.3-8.
62. Site da Globaltech, desenvolvedor do software Minitab. Disponível em: <http://www.minitabbrasil.com.br/?gclid=CN-v5NztmJQCFQUjGgodIBHf7w>, acessado em junho de 2008.
63. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás (IBP), Apostila de Curso de Introdução a Estatística Aplicada a Validação de Ensaios, 2002.
64. Site do professor doutor Chatsiri Piyapimonsit, Universidade de Kasetsart, Faculdade de Educação. Disponível em: <http://www.watpon.com/table/cochran.pdf>

acessada em julho de 2008.

65. Site do Departamento de Estatística e Investigação Operacional, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Disponível em: www.deio.fc.ul.pt, acessada em julho de 2008.

66. Taylor, J. K., *Quality Assurance of Chemical Measurements*, Michigan: Lewis Publishers, 1987.

67. Devore, J.L. *Probabilidade e Estatística para Engenharia e Ciências*, 6. ed., São Paulo: Thomson Learning, 2006.

ANEXOS

Anexo 1: Tabela de Cochran (alfa=0,01)⁶⁴

k	Número de graus de liberdade de cada conjunto													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	∞
2	0.9999	0.9950	0.9794	0.9586	0.9373	0.9172	0.8988	0.8823	0.8674	0.8539	0.7949	0.7067	0.6062	0.5000
3	0.9933	0.9423	0.8831	0.8335	0.7933	0.7606	0.7335	0.7107	0.6912	0.6743	0.6059	0.5153	0.4230	0.3333
4	0.9876	0.8643	0.7814	0.7212	0.6761	0.6410	0.6129	0.5897	0.5702	0.5536	0.4884	0.4057	0.3251	0.2500
5	0.9279	0.7885	0.6957	0.6329	0.5875	0.5531	0.5259	0.5037	0.4854	0.4697	0.4094	0.3351	0.2644	0.2000
6	0.8828	0.7218	0.6258	0.5635	0.5195	0.4866	0.4608	0.4401	0.4229	0.4084	0.3529	0.2858	0.2229	0.1667
7	0.8376	0.6644	0.5685	0.5080	0.4659	0.4347	0.4105	0.3911	0.3751	0.3616	0.3105	0.2494	0.1929	0.1429
8	0.7945	0.6152	0.5209	0.4627	0.4226	0.3932	0.3704	0.3522	0.3373	0.3248	0.2779	0.2214	0.1700	0.1250
9	0.7544	0.5727	0.4810	0.4251	0.3870	0.3592	0.3378	0.3207	0.3067	0.2950	0.2514	0.1992	0.1521	0.1111
10	0.7175	0.5358	0.4469	0.3934	0.3572	0.3308	0.3106	0.2945	0.2813	0.2704	0.2297	0.1811	0.1376	0.1000
12	0.6528	0.4751	0.3919	0.3428	0.3099	0.2861	0.2680	0.2535	0.2419	0.2320	0.1961	0.1535	0.1157	0.0833
15	0.5747	0.4069	0.3317	0.2882	0.2593	0.2386	0.2228	0.2104	0.2002	0.1918	0.1612	0.1251	0.0934	0.0667
20	0.4799	0.3297	0.2654	0.2288	0.2048	0.1877	0.1748	0.1646	0.1567	0.1501	0.1248	0.0960	0.0709	0.0500
24	0.4247	0.2871	0.2295	0.1970	0.1759	0.1608	0.1495	0.1406	0.1338	0.1283	0.1060	0.0810	0.0695	0.0417
30	0.3632	0.2412	0.1913	0.1635	0.1454	0.1327	0.1232	0.1157	0.1100	0.1054	0.0867	0.0658	0.0480	0.0333
40	0.2940	0.1915	0.1508	0.1281	0.1135	0.1033	0.0957	0.0898	0.0853	0.0816	0.0668	0.0503	0.0363	0.0250
60	0.2151	0.1371	0.1069	0.0902	0.0796	0.0722	0.0668	0.0625	0.0594	0.0567	0.0461	0.0344	0.0245	0.0167
120	0.1225	0.0759	0.0585	0.0489	0.0429	0.0387	0.0357	0.0334	0.0316	0.0302	0.0242	0.0178	0.0125	0.0083
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Número de conjuntos comparados

Anexo 2: Tabela de Cochran (alfa=0,05)⁶⁴

k	Número de graus de liberdade de cada conjunto										∞			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		16	36	144
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9869	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
24	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Número de conjuntos comparados

Anexo 3: Tabela de Grubbs⁶⁶

Número de valores	Risco de falsa rejeição					
	0,1%	0,5%	1%	5%	10%	
3	1,155	1,155	1,155	1,153	1,148	
4	1,496	1,496	1,492	1,463	1,425	
5	1,760	1,764	1,749	1,672	1,602	
6	2,011	1,973	1,944	1,822	1,729	
7	2,201	2,139	2,097	1,938	1,828	
8	2,358	2,274	2,221	2,032	1,909	
9	2,492	2,387	2,323	2,110	1,977	
10	2,606	2,482	2,410	2,176	2,036	
15	2,997	2,806	2,705	2,409	2,247	
20	3,230	3,001	2,884	2,557	2,385	
25	3,389	3,135	3,009	2,663	2,486	
50	3,789	3,483	3,336	2,956	2,768	
100	4,084	3,754	3,600	3,207	3,017	

Anexo 4: Tabela de Teste F⁶⁷

Valores Críticos para Distribuições F

		$\nu_1 = \text{gl do numerador}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
$\nu_2 = \text{graus de liberdade do denominador}$	1	0,100	39,86	49,50	53,59	55,83	57,24	58,20	58,91	59,44	59,86
		0,050	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54
		0,010	4052,2	4999,5	5403,4	5624,6	5763,6	5859,0	5928,4	5981,1	6022,5
		0,001	405284	500000	540379	562500	576405	585937	592873	598144	602284
	2	0,100	8,53	9,00	9,16	9,24	9,29	9,33	9,35	9,37	9,38
		0,050	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38
		0,010	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39
		0,001	998,50	999,00	999,17	999,25	999,30	999,33	999,36	999,37	999,39
	3	0,100	5,54	5,46	5,39	5,34	5,31	5,28	5,27	5,25	5,24
		0,050	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81
		0,010	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35
		0,001	167,03	148,50	141,11	137,10	134,58	132,85	131,58	130,62	129,86
	4	0,100	4,54	4,32	4,19	4,11	4,05	4,01	3,98	3,95	3,94
		0,050	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00
		0,010	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66
		0,001	74,14	61,25	56,18	53,44	51,71	50,53	49,66	49,00	48,47
	5	0,100	4,06	3,78	3,62	3,52	3,45	3,40	3,37	3,34	3,32
		0,050	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77
		0,010	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16
		0,001	47,18	37,12	33,20	31,09	29,75	28,83	28,16	27,65	27,24
	6	0,100	3,78	3,46	3,29	3,18	3,11	3,05	3,01	2,98	2,96
		0,050	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10
		0,010	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98
		0,001	35,51	27,00	23,70	21,92	20,80	20,03	19,46	19,03	18,69
	7	0,100	3,59	3,26	3,07	2,96	2,88	2,83	2,78	2,75	2,72
		0,050	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68
		0,010	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72
		0,001	29,25	21,69	18,77	17,20	16,21	15,52	15,02	14,63	14,33
	8	0,100	3,46	3,11	2,92	2,81	2,73	2,67	2,62	2,59	2,56
		0,050	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39
		0,010	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91
		0,001	25,41	18,49	15,83	14,39	13,48	12,86	12,40	12,05	11,77
	9	0,100	3,36	3,01	2,81	2,69	2,61	2,55	2,51	2,47	2,44
		0,050	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18
		0,010	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35
		0,001	22,86	16,39	13,90	12,56	11,71	11,13	10,70	10,37	10,11
	10	0,100	3,29	2,92	2,73	2,61	2,52	2,46	2,41	2,38	2,35
		0,050	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02
		0,010	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94
		0,001	21,04	14,91	12,55	11,28	10,48	9,93	9,52	9,20	8,96
	11	0,100	3,23	2,86	2,66	2,54	2,45	2,39	2,34	2,30	2,27
		0,050	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90
		0,010	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63
		0,001	19,69	13,81	11,56	10,35	9,58	9,05	8,66	8,35	8,12
	12	0,100	3,18	2,81	2,61	2,48	2,39	2,33	2,28	2,24	2,21
		0,050	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80
		0,010	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39
		0,001	18,64	12,97	10,80	9,63	8,89	8,38	8,00	7,71	7,48

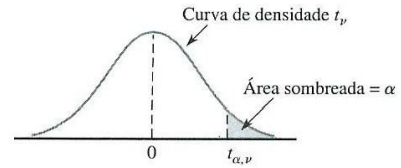
Anexo 5: Continuação da Tabela de Teste F⁶⁷

Valores Críticos para Distribuições F

$\nu_1 = \text{gl do numerador}$										
10	12	15	20	25	30	40	50	60	120	1000
60,19	60,71	61,22	61,74	62,05	62,26	62,53	62,69	62,79	63,06	63,30
241,88	243,91	245,95	248,01	249,26	250,10	251,14	251,77	252,20	253,25	254,19
6055,8	6106,3	6157,3	6208,7	6239,8	6260,6	6286,8	6302,5	6313,0	6339,4	6362,7
605621	610668	615764	620908	624017	626099	628712	630285	631337	633972	636301
9,39	9,41	9,42	9,44	9,45	9,46	9,47	9,47	9,47	9,48	9,49
19,40	19,41	19,43	19,45	19,46	19,46	19,47	19,48	19,48	19,49	19,49
99,40	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,47	99,48	99,48	99,49	99,50
999,40	999,42	999,43	999,45	999,46	999,47	999,47	999,48	999,48	999,49	999,50
5,23	5,22	5,20	5,18	5,17	5,17	5,16	5,15	5,15	5,14	5,13
8,79	8,74	8,70	8,66	8,63	8,62	8,59	8,58	8,57	8,55	8,53
27,23	27,05	26,87	26,69	26,58	26,50	26,41	26,35	26,32	26,22	26,14
129,25	128,32	127,37	126,42	125,84	125,45	124,96	124,66	124,47	123,97	123,53
3,92	3,90	3,87	3,84	3,83	3,82	3,80	3,80	3,79	3,78	3,76
5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,70	5,69	5,66	5,63
14,55	14,37	14,20	14,02	13,91	13,84	13,75	13,69	13,65	13,56	13,47
48,05	47,41	46,76	46,10	45,70	45,43	45,09	44,88	44,75	44,40	44,09
3,30	3,27	3,24	3,21	3,19	3,17	3,16	3,15	3,14	3,12	3,11
4,74	4,68	4,62	4,56	4,52	4,50	4,46	4,44	4,43	4,40	4,37
10,05	9,89	9,72	9,55	9,45	9,38	9,29	9,24	9,20	9,11	9,03
26,92	26,42	25,91	25,39	25,08	24,87	24,60	24,44	24,33	24,06	23,82
2,94	2,90	2,87	2,84	2,81	2,80	2,78	2,77	2,76	2,74	2,72
4,06	4,00	3,94	3,87	3,83	3,81	3,77	3,75	3,74	3,70	3,67
7,87	7,72	7,56	7,40	7,30	7,23	7,14	7,09	7,06	6,97	6,89
18,41	17,99	17,56	17,12	16,85	16,67	16,44	16,31	16,21	15,98	15,77
2,70	2,67	2,63	2,59	2,57	2,56	2,54	2,52	2,51	2,49	2,47
3,64	3,57	3,51	3,44	3,40	3,38	3,34	3,32	3,30	3,27	3,23
6,62	6,47	6,31	6,16	6,06	5,99	5,91	5,86	5,82	5,74	5,66
14,08	13,71	13,32	12,93	12,69	12,53	12,33	12,20	12,12	11,91	11,72
2,54	2,50	2,46	2,42	2,40	2,38	2,36	2,35	2,34	2,32	2,30
3,35	3,28	3,22	3,15	3,11	3,08	3,04	3,02	3,01	2,97	2,93
5,81	5,67	5,52	5,36	5,26	5,20	5,12	5,07	5,03	4,95	4,87
11,54	11,19	10,84	10,48	10,26	10,11	9,92	9,80	9,73	9,53	9,36
2,42	2,38	2,34	2,30	2,27	2,25	2,23	2,22	2,21	2,18	2,16
3,14	3,07	3,01	2,94	2,89	2,86	2,83	2,80	2,79	2,75	2,71
5,26	5,11	4,96	4,81	4,71	4,65	4,57	4,52	4,48	4,40	4,32
9,89	9,57	9,24	8,90	8,69	8,55	8,37	8,26	8,19	8,00	7,84
2,32	2,28	2,24	2,20	2,17	2,16	2,13	2,12	2,11	2,08	2,06
2,98	2,91	2,85	2,77	2,73	2,70	2,66	2,64	2,62	2,58	2,54
4,85	4,71	4,56	4,41	4,31	4,25	4,17	4,12	4,08	4,00	3,92
8,75	8,45	8,13	7,80	7,60	7,47	7,30	7,19	7,12	6,94	6,78
2,25	2,21	2,17	2,12	2,10	2,08	2,05	2,04	2,03	2,00	1,98
2,85	2,79	2,72	2,65	2,60	2,57	2,53	2,51	2,49	2,45	2,41
4,54	4,40	4,25	4,10	4,01	3,94	3,86	3,81	3,78	3,69	3,61
7,92	7,63	7,32	7,01	6,81	6,68	6,52	6,42	6,35	6,18	6,02
2,19	2,15	2,10	2,06	2,03	2,01	1,99	1,97	1,96	1,93	1,91
2,75	2,69	2,62	2,54	2,50	2,47	2,43	2,40	2,38	2,34	2,30
4,30	4,16	4,01	3,86	3,76	3,70	3,62	3,57	3,54	3,45	3,37
7,29	7,00	6,71	6,40	6,22	6,09	5,93	5,83	5,76	5,59	5,44

Anexo 6: Tabela de Teste t-Student⁶⁷

Valores Críticos para as Distribuições t



ν	α						
	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0005
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	318,31	636,62
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,326	31,598
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,213	12,924
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610	3,922
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
32	1,309	1,694	2,037	2,449	2,738	3,365	3,622
34	1,307	1,691	2,032	2,441	2,728	3,348	3,601
36	1,306	1,688	2,028	2,434	2,719	3,333	3,582
38	1,304	1,686	2,024	2,429	2,712	3,319	3,566
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,262	3,496
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
120	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,160	3,373
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

Anexo 7: Tabela de χ^2 (Bartlett)⁶⁵

Distribuição do Qui-Quadrado - χ^2_n

Os valores tabelados correspondem aos pontos x tais que: $P(\chi^2_n \leq x)$

n	$P(\chi^2_n \leq x)$												
	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995
1	3,935-05	0,000157	0,000982	0,003932	0,016	0,102	0,455	1,323	2,706	3,841	5,024	6,635	7,879
2	0,010	0,020	0,051	0,103	0,211	0,575	1,366	2,773	4,605	5,991	7,378	9,210	10,597
3	0,072	0,115	0,216	0,352	0,584	1,213	2,366	4,108	6,251	7,815	9,348	11,345	12,838
4	0,207	0,297	0,484	0,711	1,064	1,923	3,357	5,385	7,779	9,488	11,143	13,277	14,860
5	0,412	0,554	0,831	1,145	1,610	2,675	4,351	6,626	9,236	11,070	12,832	15,086	16,750
6	0,676	0,872	1,237	1,635	2,204	3,455	5,348	7,841	10,645	12,592	14,449	16,812	18,548
7	0,989	1,339	1,690	2,167	2,833	4,255	6,346	9,037	12,017	14,067	16,013	18,475	20,278
8	1,344	1,647	2,180	2,733	3,490	5,071	7,344	10,219	13,362	15,507	17,535	20,090	21,955
9	1,735	2,088	2,700	3,325	4,168	5,899	8,343	11,389	14,684	16,919	19,023	21,666	23,589
10	2,156	2,558	3,247	3,940	4,865	6,737	9,342	12,549	15,987	18,307	20,483	23,209	25,188
11	2,603	3,053	3,816	4,575	5,578	7,584	10,341	13,701	17,275	19,675	21,920	24,725	26,757
12	3,074	3,571	4,404	5,226	6,304	8,438	11,340	14,845	18,549	21,026	23,337	26,217	28,300
13	3,565	4,107	5,009	5,892	7,041	9,299	12,340	15,984	19,812	22,362	24,736	27,688	29,819
14	4,075	4,660	5,629	6,571	7,790	10,165	13,339	17,117	21,064	23,685	26,119	29,141	31,319
15	4,601	5,229	6,262	7,261	8,547	11,037	14,339	18,245	22,307	24,996	27,488	30,578	32,801
16	5,142	5,812	6,908	7,962	9,312	11,912	15,338	19,369	23,542	26,296	28,845	32,000	34,267
17	5,697	6,408	7,564	8,672	10,085	12,792	16,338	20,489	24,769	27,587	30,191	33,409	35,718
18	6,265	7,015	8,231	9,390	10,865	13,675	17,338	21,605	25,989	28,869	31,526	34,805	37,156
19	6,844	7,633	8,907	10,117	11,651	14,562	18,338	22,718	27,204	30,144	32,852	36,191	38,582
20	7,434	8,260	9,591	10,851	12,443	15,452	19,337	23,828	28,412	31,410	34,170	37,566	39,997
21	8,034	8,897	10,383	11,591	13,240	16,344	20,337	24,935	29,615	32,671	35,479	38,932	41,401
22	8,643	9,542	10,982	12,338	14,041	17,240	21,337	26,039	30,813	33,924	36,781	40,289	42,796
23	9,260	10,196	11,689	13,091	14,848	18,137	22,337	27,141	32,007	35,172	38,076	41,638	44,181
24	9,886	10,856	12,401	13,848	15,659	19,037	23,337	28,241	33,196	36,415	39,364	42,980	45,558
25	10,520	11,524	13,120	14,611	16,473	19,939	24,337	29,339	34,382	37,652	40,646	44,314	46,928
26	11,160	12,198	13,844	15,379	17,292	20,843	25,336	30,435	35,563	38,885	41,923	45,642	48,290
27	11,808	12,878	14,573	16,151	18,114	21,749	26,336	31,528	36,741	40,113	43,195	46,963	49,645
28	12,461	13,565	15,308	16,928	18,939	22,657	27,336	32,630	37,916	41,337	44,461	48,278	50,994
29	13,121	14,256	16,047	17,708	19,768	23,567	28,336	33,711	39,087	42,557	45,722	49,588	52,335
30	13,787	14,953	16,791	18,493	20,599	24,478	29,336	34,800	40,256	43,773	46,979	50,892	53,672
40	20,707	22,164	24,433	26,509	29,051	33,660	39,335	45,616	51,805	55,758	59,342	63,691	66,766
50	27,991	29,707	32,357	34,764	37,689	42,942	49,334	56,334	63,167	67,505	71,420	76,154	79,490
60	35,534	37,485	40,482	43,188	46,459	52,294	59,335	66,981	74,397	79,082	83,298	88,379	91,952
70	43,275	45,442	48,758	51,739	55,329	61,698	69,334	77,577	85,527	90,531	95,023	100,425	104,215
80	51,172	53,540	57,153	60,391	64,278	71,145	79,334	88,130	96,578	101,879	106,629	112,329	116,321
90	59,196	61,754	65,647	69,126	73,291	80,625	89,334	98,650	107,565	113,145	118,136	124,116	128,299
100	67,328	70,065	74,222	77,929	82,358	90,133	99,334	109,141	118,498	124,342	129,561	135,807	140,170

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)