

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

Viviane Faria Morais Jotta

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO USADO NA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
TOTAIS EM EQUIPAMENTOS DE PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES**

Belo Horizonte (MG)

2021

Viviane Faria Morais Jotta

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO USADO NA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
TOTAIS EM EQUIPAMENTOS DE PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química Tecnológica.**

**Orientador: Prof. Dr. Cleverson Fernando
Garcia.**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Sueli de
Rezende**

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2021

Viviane Faria Morais Jotta

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO USADO NA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
TOTAIS EM EQUIPAMENTOS DE PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES**

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

Belo Horizonte, 23 de agosto de 2021

**Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia
(orientador – CEFET-MG)**

**Prof^a. Dra. Patrícia Sueli de Rezende
(co-orientadora – CEFET-MG)**

**Prof^a. Dra. Esther Maria Ferreira Lucas
(avaliadora - CEFET-MG)**

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Napoleão Nogueira Jotta e Eliana de Faria Morais Jotta, a minha avó, Clélia de Faria Morais (*In memoriam*) e ao meu namorado, Felipe Viégas Borges.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Eliana, que se esforçaram muito para que eu tivesse a possibilidade de ter uma boa educação. Agradeço pelos ensinamentos, pelo apoio, pela compreensão e pela ajuda durante todo o curso de Química Tecnológica.

Ao meu irmão pelo incentivo para melhorar e crescer.

Ao Felipe pelo apoio e carinho durante todos os momentos difíceis.

Ao Rangel pela orientação e ensinamentos não apenas para a realização deste trabalho, mas também no âmbito profissional.

Aos demais amigos e supervisores da Fundação Ezequiel Dias pela demonstração de trabalho com amor, pelo carinho, atenção e disponibilidade e, principalmente, pelos ensinamentos.

Ao meu orientador, professor Cleverson Garcia pela paciência, orientação e atenção.

A minha co-orientadora, professora Patrícia Sueli pela paciência, disponibilidade, carinho e compreensão.

Aos demais professores do CEFET, em especial Janice Cardoso e Márcio Basílio, pela atenção e inúmeros ensinamentos não apenas sobre a teoria e prática da química, mas sobre a vida.

A Isabella, amiga querida que passou todos os momentos comigo e me motivou a ser uma pessoa melhor, me apoiou e me ouviu.

Aos demais amigos e colegas que me ajudaram na minha formação.

RESUMO

JOTTA, V. F. M.; GARCIA, C. F.; REZENDE, P. S. Validação de método usado na quantificação de proteínas totais em equipamentos de produção de soros hiperimunes.

Soros hiperimunes são produtos farmacêuticos fabricados a partir de plasma sanguíneo e utilizadas para tratamento contra picadas de animais peçonhentos, sendo, cada soro, específico para uma ou mais toxinas provenientes de diferentes animais. Apenas nos primeiros três meses de 2021 foram notificados 37.908 casos de acidentes com animais peçonhentos no Brasil, mostrando-se a necessidade da contínua fabricação desses produtos. No país, uma das empresas responsáveis pela sua produção é a Fundação Ezequiel Dias, porém, como os mesmos equipamentos são utilizados para fabricação de diferentes tipos de soros hiperimunes, a verificação da limpeza da linha produtiva se torna essencial. Para a constatação de uma limpeza efetiva, o controle de qualidade da Fundação Ezequiel Dias foi responsável por determinar e validar uma metodologia com este objetivo. Assim, escolheu-se um método de determinação de proteína denominado Micro BCA e utilizou-se o kit de análise da Thermo Fisher Scientific, considerando-se a elevada presença dessa substância no plasma sanguíneo. Para a validação deste método constatou-se que os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão estão de acordo com os critérios estabelecidos pela AOAC *International*, o parâmetro de linearidade determinou a necessidade de uma regressão quadrática, os limites de detecção e quantificação foram estimados em $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a robustez mostrou a necessidade de controle de algumas variáveis durante as análises, sendo reconhecidos como satisfatórios. Portanto, o método foi considerado adequado para fins de verificação da limpeza da linha produtiva de soros hiperimunes da Fundação Ezequiel Dias.

Palavras-chave: Soros hiperimunes. Proteínas. Micro BCA. Validação analítica.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de acidentes com animais peçonhentos ocorridos nos estados do Brasil e no Distrito Federal entre janeiro e março de 2021	6
Gráfico 2 – Distribuição dos acidentes no Brasil por tipo de animal peçonhento ocorridos entre janeiro e março de 2021.....	6
Gráfico 3 – Número de mortes, curas e casos não especificados relacionados a ataques de animais peçonhentos no Brasil, entre janeiro e março de 2021.....	7
Gráfico 4 – Período de atendimento em relação ao número de pessoas curadas do ataque de animais peçonhentos no Brasil, entre janeiro e março de 2021.....	8
Gráfico 5 – Comparação entre curvas de calibração de diferentes métodos para determinação de proteínas.....	17
Gráfico 6 – Comparação entre limites de detecção dos métodos de determinação de proteínas	17
Gráfico 7 – Dispersão de pontos e modelo de regressão linear aplicados aos dados das soluções padrão	37
Gráfico 8 – Correlação entre resíduos da regressão linear	38
Gráfico 9 – Distribuição de resíduos para o modelo linear	40
Gráfico 10 – Dispersão de pontos e modelo de regressão quadrático aplicados aos dados das soluções padrão	41
Gráfico 11 – Correlação entre resíduos da regressão quadrática.....	42
Gráfico 12 – Distribuição de resíduos para o modelo quadrático	43
Gráfico 13 – Modelo quadrático final	44
Gráfico 14 - Comparação entre curvas de calibração alterando o tratamento da amostra	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 – Sequência de ações na purificação do plasma.....	9
Figura 1 – Reação de biureto.....	13
Figura 2 – Reação do método de Bradford.....	14
Figura 3 – Reação do método BCA.....	15
Figura 4 – Resultado visual do teste de linearidade	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais tipos de soros hiperimunes produzidos no Brasil e suas aplicações	4
Quadro 2 – Parâmetros considerados na validação analítica.....	19
Quadro 3 – Matriz de ensaios codificados do teste de robustez de acordo com <i>Youden Steiner</i>	32
Quadro 4 – Matriz de ensaios do teste de robustez	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de aceitação de resíduos de proteínas na linha produtiva de soros hiperimunes da Fundação Ezequiel Dias.....	12
Tabela 2 – Critérios de aceitação para precisão	22
Tabela 3 – Critérios de aceitação para exatidão	23
Tabela 4 – Preparo das diluições de albumina para a curva de calibração.....	28
Tabela 5 – Fatores e níveis para o teste de robustez.....	32
Tabela 6 – Resultados do teste de linearidade	35
Tabela 7 – Resultados da seletividade	46
Tabela 8 – Porcentagem de recuperação das amostras considerando os dias 1 e 2.....	49
Tabela 9 – Valores de DPR por nível de concentração	50
Tabela 10 – Valores da estatística F (F_{calc}) e do valor p relacionados ao teste de <i>Youden Steiner</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
BCA	Ácido bicinconínico
CBBG	Coomassie brilhante G-250
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
LD	Limite de detecção
LFS	Lote final de soro
LQ	Limite de quantificação
MRC	Material de referência certificado
SPAG	Soro produto acabado granel
SUS	Sistema Unificado de Saúde
USP	<i>United States Pharmacopeial</i> (Farmacopeia americana)
UV	Ultravioleta
WR	<i>Working reagent</i> (Reagente de trabalho)

LISTA DE SÍMBOLOS

r	Coefficiente de Pearson
R^2	Coefficiente de determinação
H_0	Hipótese nula
H_a	Hipótese alternativa
%	Porcentagem
σ	Desvio padrão populacional
μ	Micro
λ	Comprimento de onda
α	Nível de significância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Soros Hiperimunes.....	3
2.1.1 Aplicações na área da saúde	5
2.1.2 Produção de soro hiperimune na Fundação Ezequiel Dias	8
2.1.3 Limpeza dos equipamentos de produção de soro	10
2.2 Determinação de Proteínas	12
2.3 Validação Analítica.....	18
2.3.1 Linearidade	19
2.3.2 Seletividade	20
2.3.3 Precisão.....	20
2.3.4 Exatidão.....	22
2.3.5 Limite de detecção	23
2.3.6 Limite de quantificação.....	24
2.3.7 Robustez	24
2.3.8 Validação de limpeza.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Reagentes, materiais e equipamentos.....	27
3.2 Método a ser validado.....	27
3.2.1 Preparo das soluções	27
3.2.2 Procedimento de análise.....	28
3.3 Validação analítica.....	29
3.3.1 Linearidade	29
3.3.2 Seletividade	29
3.3.3 Precisão e exatidão.....	30
3.3.4 Limites de detecção e quantificação.....	31

3.3.5	Robustez	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Linearidade	34
4.1.1	Modelo linear	36
4.1.2	Modelo quadrático	41
4.2	Seletividade	45
4.3	Precisão e exatidão	47
4.4	Limite de detecção e quantificação	50
4.5	Robustez	52
5.	CONCLUSÃO	54
6.	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

A soroterapia é reconhecida como o tratamento para acidentes com animais peçonhentos objetivando-se neutralizar as toxinas de seus venenos. Ou seja, se trata da administração de soros hiperimunes a pacientes que sofreram tais acidentes. De acordo com a Farmacopeia Brasileira, soro hiperimune para uso humano é definido como preparação que contém imunoglobulinas específicas e purificadas que são capazes de neutralizar bactérias, vírus ou toxinas provenientes do veneno de uma ou mais espécies de animais peçonhentos (ACCONCI, 1999; ANVISA, 2019).

No Brasil, acidentes com animais peçonhentos são bastante comuns. Apenas nos três primeiros meses do ano de 2021 foram notificados cerca de 40.000 casos de acidentes, incluindo serpentes, aranhas, abelhas, escorpiões, entre outros, sendo Minas Gerais e São Paulo os estados com maior número de casos (BRASIL, 2021).

A ação do veneno desses animais pode causar desde reações leves, como lesões no local da picada e náuseas, até reações mais graves, como hipertensão arterial e sudorese generalizada, podendo levar à morte do paciente. Dados recentes, relacionados aos três primeiros meses de 2021, revelam a ocorrência de 88 mortes. Assim, para evitar agravamento do quadro de saúde do paciente, o tempo entre o acidente a o atendimento deve ser o menor possível para que o veneno que circula na corrente sanguínea seja neutralizado (BRASIL, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Quando comparado a outros países, o Brasil se destaca na distribuição de soros hiperimunes, mantendo o Programa Nacional de Imunizações, responsável pela garantia de um produto de qualidade de maneira gratuita a toda população (SANTOS, 2005). Já a produção do soro hiperimune é responsabilidade do Instituto Butantan, do Instituto Vital Brazil, do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos e da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) (MONACO, 2018; SOBRINHO *et al.*, 2011).

A FUNED é a única produtora de soros hiperimunes em Minas Gerais, sendo responsável pela fabricação de soros anti-peçonhentos, antitóxicos e antivirais. Ao todo são oito soros hiperimunes diferentes provenientes de um criadouro com cerca de 200 serpentes e outros animais. Nesta instituição, os mesmos equipamentos da linha produtiva são utilizados para produção de todos os tipos de soro, necessitando de um controle de qualidade rígido do processo

de limpeza (MINAS GERAIS, 2018; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2021a). Assim, para verificar se o processo de limpeza da linha produtiva foi eficiente, é necessário conduzir uma validação de limpeza com o auxílio de um método para quantificação de proteínas totais.

Existem vários métodos para determinação de proteínas totais, sendo, em sua maioria, métodos espectrofotométricos. Exemplos mais comuns são Lowry, Smith, Bradford e Petersen, métodos antigos desenvolvidos entre 1951 e 1985 sendo utilizados até hoje. Existem diversas adaptações destes descritos na literatura tornando-o mais prático, econômico e sensível. Além desses métodos que envolvem a presença de um grupo cromóforo, existe o método de absorção no ultravioleta, porém a seletividade é pequena devido ao grande número de substâncias que absorvem luz no mesmo comprimento de onda (LOWRY *et al.*, 1951; SMITH *et al.*, 1985; SVOBODOVA *et al.*, 2018)

Assim, o presente trabalho teve como objetivo validar um método espectrofotométrico para determinação de proteínas, a ser utilizado na avaliação da limpeza da linha produtiva de soros hiperimunes da FUNED.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soros Hiperimunes

O sistema imunológico é responsável pela proteção do organismo, possuindo dois tipos de imunidade. Uma delas é a imunidade adquirida que ocorre quando as células produzem o chamado anticorpo ou imunoglobulina específica, após a invasão de antígenos. As imunoglobulinas ou anticorpos combatem o antígeno, sendo específicos para ele. Esse tipo de imunidade cria células de memória que geram respostas imediatas a uma nova invasão, sendo a referida resposta também produzida por meio da utilização de vacinas (MONACO, 2018).

O outro tipo de imunidade é a passiva, que ocorre quando o organismo recebe anticorpos produzidos por outro organismo para o combate a um antígeno específico, porém de forma mais rápida. O lado negativo deste tipo de imunidade é a sua curta duração, não sendo produzidas células de memória. Assim, a cada nova invasão, é necessária a introdução de novos anticorpos. Esse é o mecanismo utilizado pelos chamados soros hiperimunes (ACCONCI, 1999; MONACO, 2018).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, soro hiperimune para uso humano é definido como preparação que contém imunoglobulinas específicas e purificadas que são capazes de neutralizar bactérias, vírus ou toxinas provenientes do veneno de uma ou mais espécies de animais peçonhentos. A administração de soros hiperimunes em pacientes com objetivo de neutralizar o veneno do animal peçonhento é chamada de soroterapia (ANVISA, 2019; LUCAS, 2006).

Existem diversos tipos de soros hiperimunes, sendo eles dependentes do animal peçonhento que o originou (Quadro 1, p. 4).

Os tipos de soros hiperimunes produzidos no mundo são dependentes das espécies presentes em cada região, sendo um fator geográfico. Portanto, os soros são produtos estratégicos de cada país, ou até mesmo região dentro de uma nação (SANTOS, 2005).

Quadro 1 - Principais tipos de soros hiperimunes produzidos no Brasil e suas aplicações

Tipo de soro	Aplicação
Soro antibotrópico	Utilizado em casos de envenenamento por serpentes do gênero <i>Bothrops</i> (jararacas)
Soro antibotrópico e anticrotálico	Utilizado em casos de envenenamento por serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> (jararacas e cascavéis, respectivamente)
Soro antibotrópico e antilaquétrico	Utilizado em caso de picadas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Lachesis</i> (jararacas e sururucus, respectivamente)
Soro anticrotálico	Utilizado em casos de envenenamento serpente do gênero <i>Crotalus</i> (cascavel)
Soro antielapídico	Utilizado em casos de picadas de serpentes conhecidas como corais verdadeiras (gênero <i>Micrurus</i>)
Soro antiescorpiônico	Utilizado em casos de picadas de qualquer espécie de escorpião do gênero <i>Tytilus</i>
Soro antirrábico	Utilizado em casos de mordedura de algum animal suspeito que provoque ferimentos graves
Soro antitetânico	Utilizado para neutralização de toxinas secretadas pelo bacilo tetânico (<i>Clostridium tetani</i>)
Soro antiaracnídico	Utilizado em caso de picadas de aranhas dos gêneros <i>Loxosceles</i> (aranha marrom) e <i>Phoneutria</i> (aranha armadeira), e escorpiões do gênero <i>Tityus</i>
Soro antilonômico	Utilizado em caso de acidentes com lagartas do gênero <i>Lonomia</i>
Soro antidiftérico	Utilizado para neutralização de toxinas secretadas pelo bacilo difteria (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)

Fonte: Adaptado de Minas Gerais (2018) e São Paulo (2017)

O desenvolvimento de soros no Brasil iniciou em 1901 em um pequeno laboratório em São Paulo, onde atualmente se encontra o Instituto Butantan. A maior contribuição desta época foi a filosofia da especificidade do soro, mostrando a necessidade de diferentes soros para cada tipo de veneno. Atualmente, quatro instituições são responsáveis pela produção de soro para o abastecimento de todo o Brasil, sendo elas: o Instituto Butantan, no estado de São Paulo; o Instituto Vital Brazil, no estado do Rio de Janeiro; a Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais; e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos no Paraná (MONACO, 2018; SOBRINHO *et al.*, 2011).

A distribuição dos soros produzidos por essas empresas é responsabilidade do Ministério da Saúde, sendo disponibilizado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Todo ano é estabelecida a necessidade de produção de soros pelo Ministério da Saúde para o ano seguinte e são determinadas cotas para cada entidade produtora, considerando a sua capacidade produtiva (MONACO, 2018, SANTOS, 2005).

2.1.1 Aplicações na área da saúde

Acidentes com animais peçonhentos ocorrem em todas as regiões do Brasil com uma grande frequência. Os Estados que mais notificaram esses acidentes foram Minas Gerais, com 7.521 casos, São Paulo, com 7.446 casos, Bahia com 3.105 e Pernambuco registrando 2.670 casos (BRASIL, 2021), como evidenciado no Gráfico 1 (p. 6).

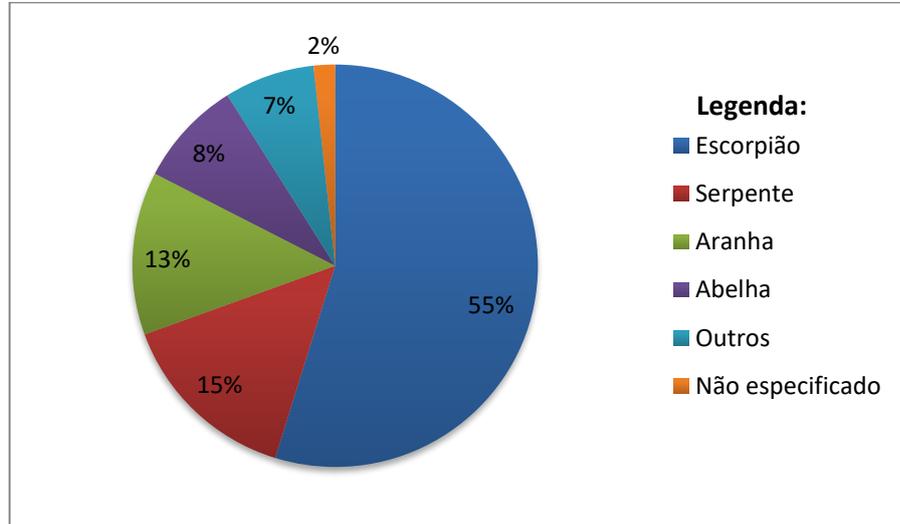
Os escorpiões são responsáveis pela maior parte dos acidentes se comparados a outros animais, possuindo ainda maior potencial de gravidade. O Gráfico 2 (p. 6) relaciona os tipos de acidentes com animais peçonhentos nos três primeiros meses de 2021. Dos 37.908 casos de acidentes, 20.766 foram provenientes desses animais, representando 55% do total. As ocorrências com serpentes e aranhas são reduzidas, representando, respectivamente, 15% e 13% desse valor. As abelhas encontram-se logo em seguida, com 3.226 casos (BRASIL, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Gráfico 1 – Número de acidentes com animais peçonhentos ocorridos nos estados do Brasil e no Distrito Federal entre janeiro e março de 2021



Fonte: Adaptado de Brasil (2021)

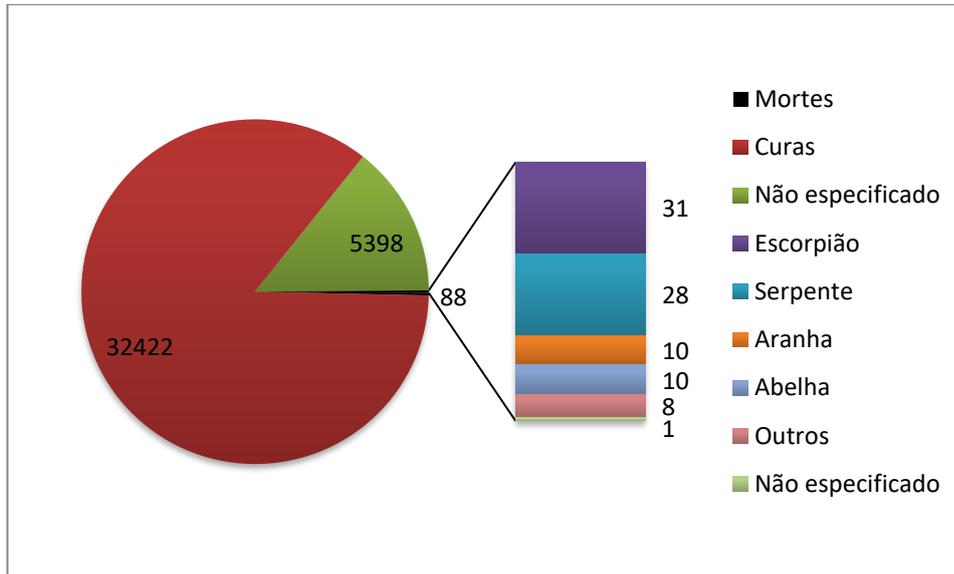
Gráfico 2 – Distribuição dos acidentes no Brasil por tipo de animal peçonhento ocorridos entre janeiro e março de 2021



Fonte: Adaptado de Brasil (2021)

As fatalidades relacionadas à ação de animais peçonhentos também apresentam a ação dos escorpiões como majoritária, seguida pelas cobras. O Gráfico 3 (p. 7) evidencia o número de mortes, curas e casos não especificados entre os meses de janeiro e março de 2021 no Brasil. Das 88 mortes catalogadas, 31 são relacionadas a escorpiões (35%). As cobras possuem uma mortalidade significativa, já que o número de casos computados para este ataque é menor, e o número de mortes se aproxima dos de escorpiões, representando cerca de 30% (BRASIL, 2021).

Gráfico 3 – Número de mortes, curas e casos não especificados relacionados a ataques de animais peçonhentos no Brasil, entre janeiro e março de 2021



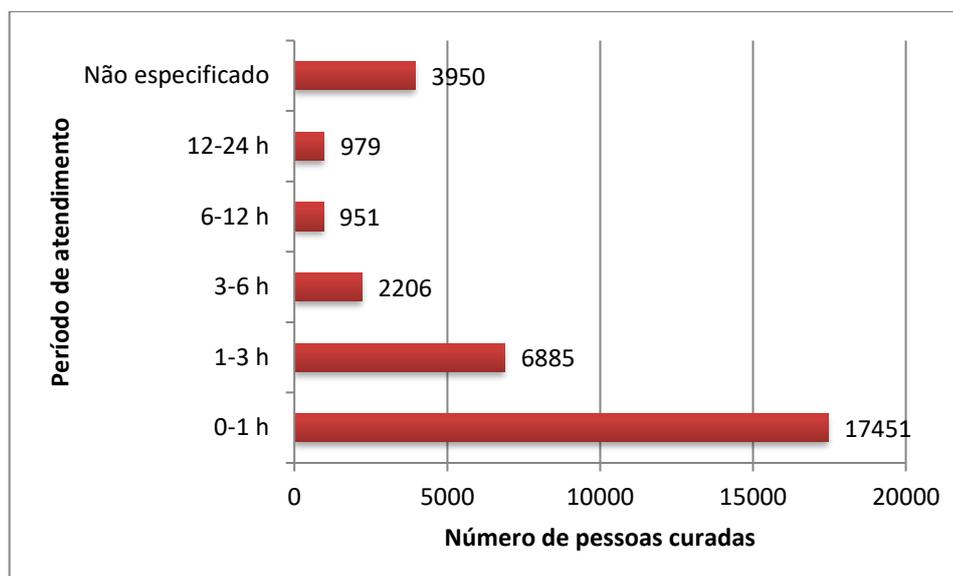
Fonte: Adaptado de Brasil (2021)

Outro dado relevante para o entendimento da importância da soroterapia é a relação entre o tempo de atendimento após o acidente e o número de pessoas curadas, apresentado pelo Gráfico 4 (p. 8). Pode-se perceber que quanto mais rápido for o atendimento após a picada, maior é a chance de cura. Isso pode ser explicado pela elevada necessidade de tratamento imediato, visto que o veneno do animal circula na corrente sanguínea e deve ser rapidamente neutralizado (BRASIL, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A gravidade do acidente depende do tipo de animal e da sua espécie, sendo classificada como leve, moderada ou grave. Já os sintomas vão desde sintomatologia no local da picada, náuseas e vômitos até sudorese generalizada, alteração da sonolência, hipertensão arterial entre outros. A soroterapia é considerada o único tratamento eficaz contra o envenenamento por animais peçonhentos e deve ser praticada de maneira rápida e eficaz (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS, 2005).

Quando comparado a outros países, o Brasil se destaca na distribuição de soros hiperimunes, mantendo o Programa Nacional de Imunizações, responsável pela garantia de um produto de qualidade de maneira gratuita a toda população (SANTOS, 2005).

Gráfico 4 – Período de atendimento em relação ao número de pessoas curadas do ataque de animais peçonhentos no Brasil, entre janeiro e março de 2021



Fonte: Adaptado de Brasil (2021)

2.1.2 Produção de soro hiperimune na Fundação Ezequiel Dias

A produção de soro é dividida em três etapas: obtenção e tratamento do veneno, obtenção do plasma e purificação do plasma. A primeira etapa se inicia no criadouro, onde existem diversas espécies de serpentes, aranhas, escorpiões, ratos etc. Os venenos destes animais são retirados, tratados, liofilizados e levados às fazendas experimentais. Na segunda etapa, denominada hiperimunização, os cavalos são inoculados e seu organismo é responsável pela produção de anticorpos. Esse processo despande cerca de 40 dias e os equinos são constantemente monitorados (LUCAS, 2006; MORAIS e MASSALDI, 2006).

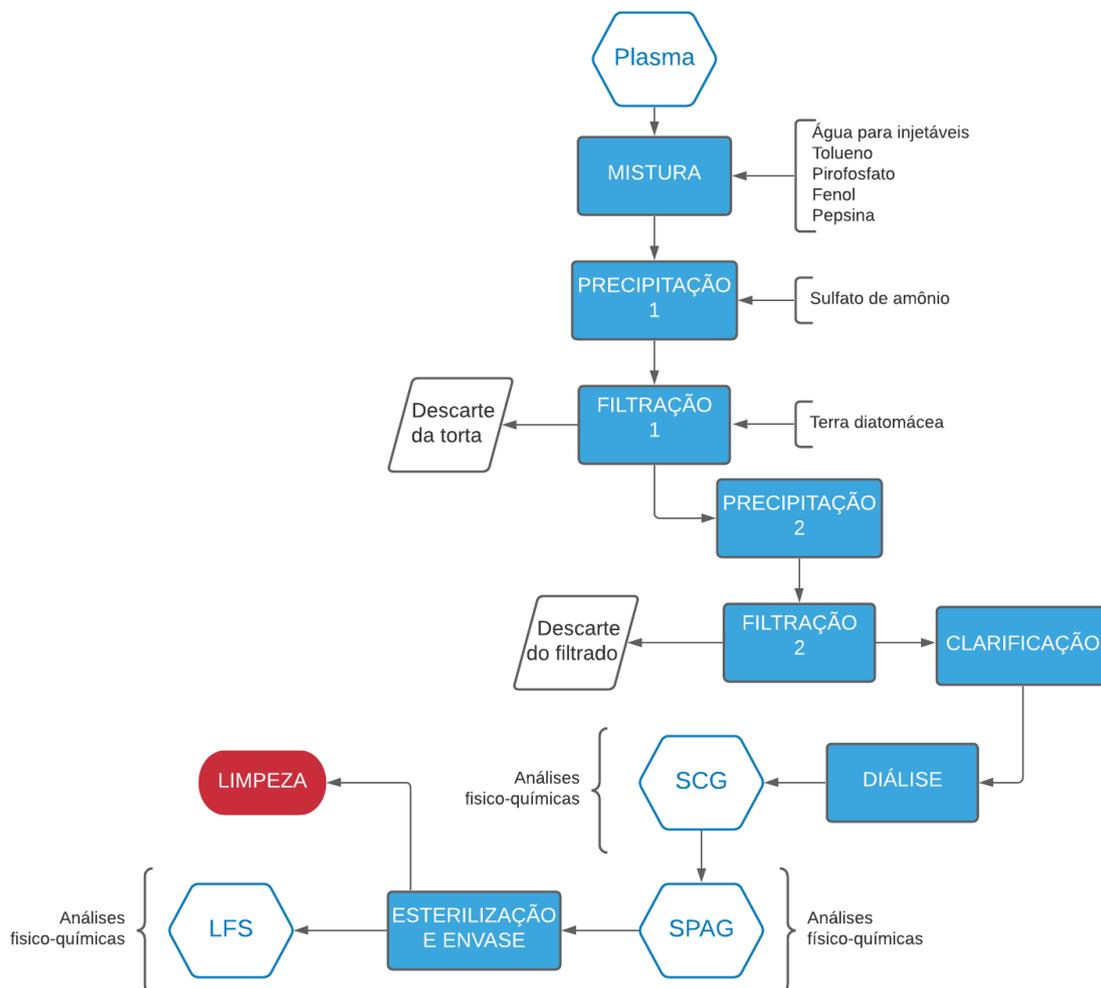
Após a sangria dos equinos, o plasma é separado e transportado para a indústria e, então, inicia-se a terceira etapa (Fluxograma 1; p. 9). A purificação tem por objetivo separar as imunoglobulinas específicas e preparar o produto para a introdução segura no corpo humano (MORAIS e MASSALDI, 2006).

O processo de purificação inicia em um reator fixo onde o plasma é inserido com alguns reagentes. São eles: água para injetáveis usada na diluição do plasma; fenol, usado na conservação e estabilização; tolueno, na eliminação de cadeias lipídicas e outras proteínas que não sejam as imunoglobulinas específicas; e pirofosfato, para inibir o ferro que possa estar presente no plasma. Além disso, adiciona-se também pepsina, responsável pela hidrólise da

imunoglobulina, tornando-a apropriada para a entrada no corpo humano (LUCAS, 2006; SANTOS, 2005; SILVA, 2019).

Em seguida, ocorre o processo de precipitação através da adição de uma solução aquosa de sulfato de amônio 12% $m\ v^{-1}$ e subsequente filtração em filtro prensa em que se adiciona terra diatomácea para auxiliar no processo (DOS ANJOS, 2006). De acordo com Faria *et al.* (2018), a terra diatomácea é muito utilizada como material filtrante nesse processo devido às suas características e propriedades físico-químicas, que incluem baixa densidade, elevada área superficial, ser leve e quimicamente inerte.

Fluxograma 1 – Sequência de ações na purificação do plasma



Sendo: SCG - Soro Concentrado Granel, SPAG - Soro Produto Acabado Granel e LFS - Lote Final de Soro.

Fonte: Autoria própria.

A torta é descartada, enquanto que o filtrado segue para o segundo reator fixo, onde ocorre uma segunda precipitação com o sulfato de amônio 20% $m\ v^{-1}$. Novamente a solução é filtrada em filtro prensa, porém o filtrado é descartado e a torta é encaminhada para um reator móvel. A

torta permanece armazenada até que a quantidade necessária para a próxima etapa seja atingida (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2015).

A torta armazenada deve ser diluída em solução salina e filtrada, em um processo chamado clarificação, para a retirada de qualquer resíduo proveniente das etapas anteriores. O filtrado, então, segue para um ultrafiltro que separa moléculas por cromatografia, com o intuito de isolar a imunoglobulina de interesse de outras substâncias, concentrando a solução. Em seguida, ainda no ultrafiltro, faz-se uma lavagem chamada de diálise, utilizando-se solução salina, gerando, assim, o soro concentrado granel (SCG). Esse soro é enviado para o controle de qualidade para a realização de análises físico-químicas (DOS ANJOS, 2006; MONACO, 2018).

Após o retorno do SCG para o processo produtivo, são feitas adições ou diluições necessárias para alcançar a fórmula do produto final, passando a se denominar soro produto acabado granel (SPAG). Novamente são realizadas análises físico-químicas para a conferência das concentrações. O processo produtivo chega ao fim, sendo necessária apenas a esterilização do SPAG e das ampolas, e o envase do produto final, gerando o lote final de soro (LFS). O controle de qualidade deve atestar a qualidade do produto final por meio de análises físico-químicas para seu transporte e distribuição (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2015).

Por fim, as análises físico-químicas realizadas no soro são dependentes da etapa de produção do soro, SCG, SPAG ou LFS e são ditadas pelo Ministério da Saúde na portaria nº 174 de 1996 (ANVISA, 1996). Para o SCG, as análises realizadas são densidade, pH e teores de sulfato de amônio, cloreto de sódio, fenol e proteínas. Em se tratando do SPAG, são aspecto, pH e teores de sulfato de amônio, cloreto de sódio, sólidos totais, fenol, nitrogênio e proteínas. O LFS, por sua vez, é vinculado às análises de aspecto, pH e volume (ANVISA, 1996; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2020).

2.1.3 Limpeza dos equipamentos de produção de soro

De acordo com o Fluxograma 1 (p. 9), pode-se perceber que a etapa final do processo produtivo é a limpeza dos equipamentos e utensílios utilizados, sendo de suma importância, visto que a contaminação por qualquer substância indesejada pode causar sérios riscos à saúde do paciente que receberá o soro hiperimune. Além disso, vale ressaltar que, na maioria dos casos, os mesmos tanques e equipamentos são utilizados para a produção de todos os tipos de soros, por isso, a limpeza entre cada processo deve ser cuidadosamente realizada para não comprometer a qualidade e integridade do produto (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2019).

As imunoglobulinas presentes nos soros hiperimunes são muito semelhantes, sendo diferenciadas apenas em pequenos resíduos de aminoácidos, que conferem sua especificidade. As características de solubilidade e, conseqüentemente, a facilidade de limpeza são semelhantes, porém a toxicidade não. Essa toxicidade está relacionada à quantidade de proteínas totais, sendo este grupo o mais perigoso para a contaminação dos tanques e equipamentos da linha produtiva (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2021a).

A limpeza pode ser realizada empregando diferentes reagentes com propriedades diversas, cada qual com a intenção de retirada de um conjunto de substâncias de interesse. Esses reagentes são distribuídos em grupos de acordo com suas funções, como, por exemplo, o grupo de fosfatos, com o intuito de reduzir a dureza da água formando complexos solúveis ou auxiliar na retirada de gorduras através da emulsificação. Para a limpeza de tanques de produção de soro, geralmente são utilizados água e hidróxido de sódio. Isso porque o grupo de substâncias alcalinas é capaz de solubilizar proteínas provenientes do plasma e promover a saponificação de ácidos graxos (ANDRADE, 2008; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2019).

De acordo com Oliveira (2019), os carboidratos e a maioria dos sais minerais são de fácil retirada, pois são solúveis em água, diferente de gorduras e proteínas. Assim a escolha do hidróxido de sódio e água para a limpeza dos tanques de produção de soro se deve à necessidade de retirada desses dois grupos, principalmente as proteínas, devido à sua toxicidade.

Para avaliação da limpeza, são conduzidas validações que, em sua maioria, utilizam a quantificação de resíduos de proteínas como parâmetro. Assim, são determinadas concentrações máximas desse resíduo que podem ser encontrados durante a verificação (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2021a). Os valores limites permitidos de resíduo de proteínas estão apresentados na Tabela 1 (p. 12).

Após a pandemia do novo coronavírus, que iniciou em 2019 e matou mais de três milhões de pessoas, a Fundação Ezequiel Dias iniciou a pesquisa e desenvolvimento de um soro hiperimune para o combate do Covid-19 com o intuito de aplicação em pacientes em estado grave. Conseqüentemente, após a inclusão do Soro Anti SARS-Cov-2, os limites de resíduo permitidos de proteína serão impactados (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2021a; OUR WORLD IN DATA, 2021; RAMOS, 2020), sendo evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites de aceitação de resíduos de proteínas na linha produtiva de soros hiperimunes da Fundação Ezequiel Dias

Linha produtiva	Limite de aceitação atual ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Limite de aceitação após a inclusão do Soro Anti SARS-Cov-2 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
SCG	5,34	2,48
SPAG/LFS	5,46	6,83

Fonte: Adaptado de Fundação Ezequiel Dias (2021a)

Uma ressalva importante é que os limites apresentados na Tabela 1 são dependentes da área do equipamento, ou seja, para o cálculo da concentração limite, deve-se considerar a área utilizada para amostragem.

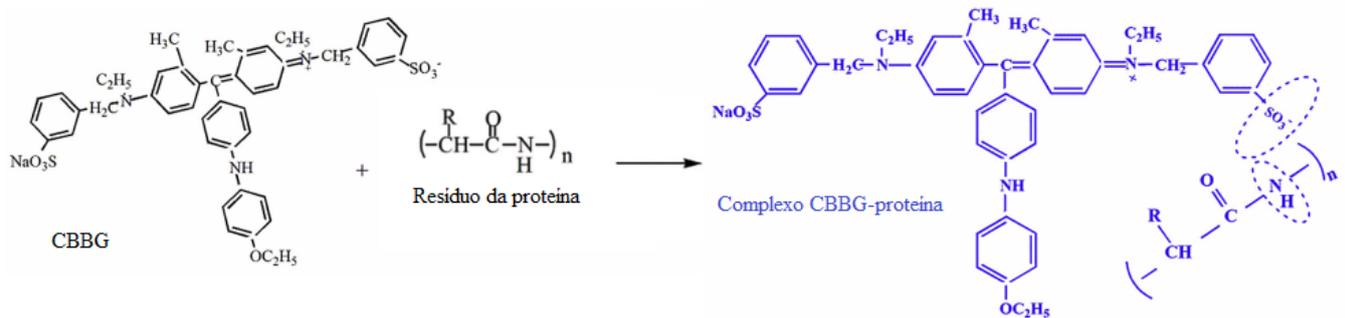
2.2 Determinação de Proteínas

Existem diversos métodos para a quantificação de proteínas, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Um deles é o tradicional método de Kjeldahl utilizado para determinação de proteínas totais através da quantificação de nitrogênio. Baseado em três etapas, digestão, destilação e titulação, o método possui a desvantagem de ser longo, despendendo muito tempo para ser concluído. Outra desvantagem é a dificuldade de distinguir nitrogênio não proteico de nitrogênio proteico, podendo ser considerado um método inadequado em alguns casos (LU, FU, 2020; SKOOG, 2008).

Uma alternativa à metodologia de Kjeldahl são os métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas. Tais métodos são utilizados amplamente em rotinas laboratoriais devido à sua rapidez, simplicidade, custo e faixa de quantificação. Existem diversas metodologias e variações, sendo os mais comuns os métodos de biureto, Lowry, Smith, Bradford e Petersen, que se baseiam na inserção de grupos cromóforos, e o método de absorção no ultravioleta, que se baseia na absorção de energia das ligações peptídicas dos aminoácidos presentes nas proteínas (LEMOS, 2016).

O método de biureto é baseado na redução de íons cobre II pelas proteínas, em meio alcalino, passando de Cu^{+2} para Cu^+ . Durante esta reação, a formação de um complexo entre os íons cobre e as proteínas é o responsável pela coloração violeta, cujas máximas absorções se dão em 270 nm e 540 nm. Apesar de o primeiro comprimento de onda apontado ser mais sensível, muitos outros analitos absorvem nessa região, portando utiliza-se, normalmente, o

Figura 2 – Reação do método de Bradford



Fonte: Adaptado de Martínez *et al.* (2020).

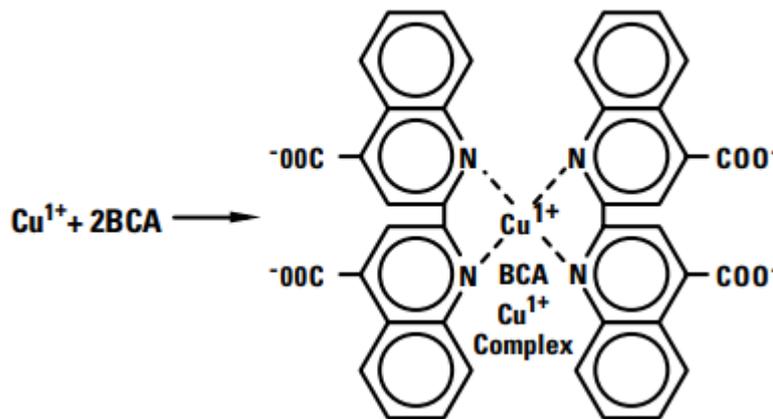
De acordo com Olson e Markwell (2007), as principais vantagens deste método são a rapidez e simplicidade, além de ser econômica. Porém, as desvantagens se estendem desde elevada variabilidade a diferentes proteínas, até respostas não esperadas quando relacionado à albumina, uma das proteínas mais comuns no plasma sanguíneo, representando cerca de 60% da massa total das proteínas (SANTOS 2012).

O método de biureto, apresentado anteriormente, é utilizado desde 1915 e, diferente do método de Bradford, possui baixíssima variabilidade entre diferentes proteínas, além de ser simples e rápido. Porém, sua sensibilidade é questionável (LEMOS, 2016). De acordo com Lowry *et al.* (1951), o método de biureto é 100 vezes menos sensível se comparado ao seu, limitando suas aplicações.

Outra alternativa que ainda utiliza grupos cromóforos como estratégia é o método de Smith ou do ácido bicinconínico (BCA). Primeiramente os íons Cu^{+2} são reduzidos a íons Cu^+ pela ação das proteínas através da reação de biureto apresentada na O método de biureto é baseado na redução de íons cobre II pelas proteínas, em meio alcalino, passando de Cu^{+2} para Cu^+ . Durante esta reação, a formação de um complexo entre os íons cobre e as proteínas é o responsável pela coloração violeta, cujas máximas absorções se dão em 270 nm e 540 nm. Apesar de o primeiro comprimento de onda apontado ser mais sensível, muitos outros analitos absorvem nessa região, portando utiliza-se, normalmente, o comprimento de onda de 540 nm para essa análise (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998). A reação descrita é denominada reação de biureto, esquematizada na Figura 1 (p. 13), e é considerada a primeira etapa para formação de complexos em outros métodos, como o de Lowry, apresentado a seguir, e o de Smith (LU, FU, 2020).

Figura 1 (p. 12) e, então, ocorre uma reação entre o Cu^+ e duas moléculas de BCA, formando um complexo de coloração roxa com máxima absorção em 562 nm (Figura 3; p. 15). Vale ressaltar que são quatro aminoácidos os responsáveis pela formação do complexo colorido, sendo eles triptofano, tirosina, cistina e cisteína (SMITH *et al.*, 1985; SVOBODOVA *et al.*, 2018).

Figura 3 – Reação do método BCA



Fonte: Adaptado de Thermo Fisher Scientific (2010)

A reação esquematizada na Figura 3 é dependente da temperatura, podendo ser 37 °C ou 60 °C dependendo da estratégia a ser utilizada, visto que o método BCA pode ser realizado de duas maneiras diferentes. A primeira delas utiliza-se o espectrofotômetro na região do ultravioleta e cubetas comuns, já a outra é uma adaptação que utiliza microplacas como ambiente para a reação e uma leitora de microplacas para a determinação a 562 nm. A alternativa mencionada possui tempo de incubação maior a uma temperatura mais baixa (37 °C), porém a quantidade de reagente utilizada é infinitamente menor, gerando menos resíduos e sendo de fácil manuseio, visto que várias determinações podem ser feitas em um curto período de tempo (OLSON, MARKWELL, 2007; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010).

Existem fornecedores comerciais que fabricam kits de análise e alguns até desenvolvem kits com adaptações dos métodos clássicos. Um exemplo é a adaptação da metodologia de Smith chamado Micro BCA, que foi realizada para aumentar a sensibilidade do método, sendo possível a leitura em faixa de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para métodos no espectrofotômetro UV e de 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para métodos na microplaca. De acordo com o fornecedor, a promessa de maior sensibilidade provém do aumento da concentração dos reagentes do kit de análises (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010).

A principal desvantagem do método BCA é a grande quantidade de interferentes, como por exemplo, lipídeos, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e sulfato de amônio. Porém, o método é simples, rápido, econômico e, principalmente, sensível (SVOBODOVA *et al.*, 2018). De acordo com Li, Zhao e Jiang (2020), o método de BCA apesar de ter diversos interferentes, é mais tolerante a detergentes e soluções-tampão simples se comparado ao método de Lowry.

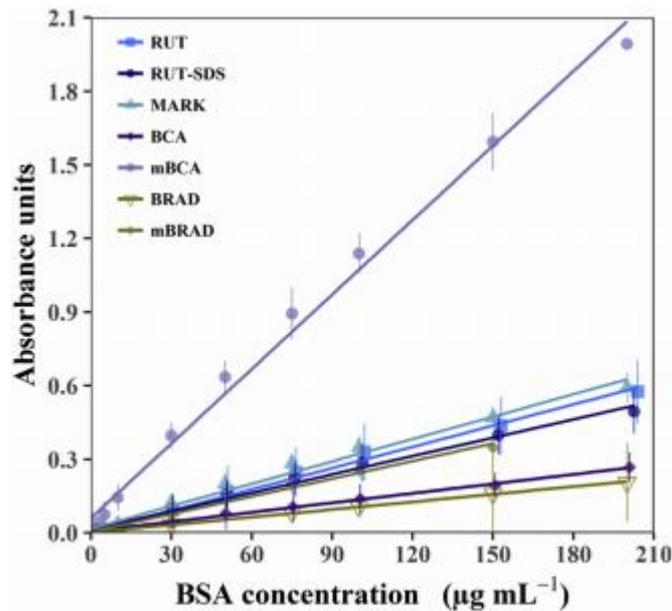
O último método corresponde à espectrofotometria de ultravioleta (UV), caracterizado como simples, além de não destrutivo. Baseando-se na absorção de proteínas a 280 nm, o método possui a desvantagem da baixa especificidade, visto que inúmeras outras substâncias também absorvem no UV, e a baixa sensibilidade (LEMOS, 2016).

Para a escolha do método utilizado para determinação de proteínas nesse trabalho alguns aspectos foram considerados, como por exemplo, a natureza da amostra (OLSON, MARKWELL, 2007). Por ser soro hiperimune a matriz é complexa e, portanto, existem vários tipos de proteínas na amostra, sendo necessário um método com baixa variabilidade a diferentes proteínas. Outra questão importante é a faixa de trabalho, visto que a validação proposta é de limpeza e deseja-se determinar resíduos de proteína. Assim um método com alta sensibilidade é requerido, além de outras qualidades como simplicidade, rapidez e ser um método econômico.

No contexto da comparação entre os métodos, Martínez *et al.* (2020) apresentam um estudo com amostras de plâncton marinho em que o micro BCA se mostrou mais sensível se comparado aos outros, visto que ocorre um aumento significativo na absorbância após o aumento da concentração de proteína (Gráfico 5; p. 17). Vale ressaltar que existem muitas variações dos métodos apresentados neste item, como por exemplo o método de Rutter ou de Markwell, que foram criados a partir de pequenas alterações do método de Lowry e que também estão sendo comparados no Gráfico 5 (p. 17).

A partir do Gráfico 6 (p. 17), também apresentado por Martínez *et al.* (2020), é possível perceber que o micro BCA possui o menor limite de detecção ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$) para a matriz estudada no trabalho.

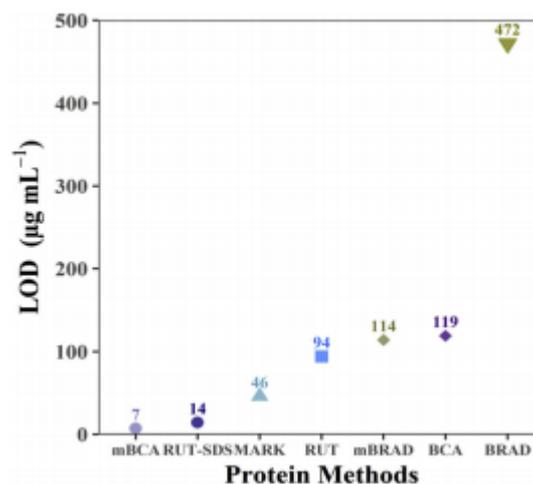
Gráfico 5 – Comparação entre curvas de calibração de diferentes métodos para determinação de proteínas



Sendo: RUT=Rutter, RUT-SDS=Rutter-SDS, MARK=Markwell, mBCA=micro BCA, BRAD=Bradford, mBRAD=microBradford, Absorbance units = Unidades de absorbância e BSA concentration = concentração de albumina.

Fonte: Martínez *et al.* (2020)

Gráfico 6 – Comparação entre limites de detecção dos métodos de determinação de proteínas



Sendo: LOD = limite de detecção e Protein Methods = métodos de determinação de proteína

Fonte: Martínez *et al.* (2020)

Segundo Thermo Fisher Scientific (2021), o método micro BCA é considerado sensível e possui baixa variabilidade entre proteínas diferentes, além das outras vantagens mencionadas, como

alta sensibilidade, simplicidade e rapidez, destacando-se dentre os outros métodos para a aplicação no presente trabalho.

A maioria dos métodos apresentados são adotados pela Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeial – USP*), inclusive o BCA, existindo a opção de escolha entre o convencional e o que utiliza microplaca. Porém, por se tratar de um kit, é necessária a validação completa desse método. Em outros casos, apenas uma validação parcial é feita, por se tratar de métodos descritos em compêndios oficiais (USP, 2021).

2.3 Validação Analítica

O termo “validação analítica” pode ser descrito de várias formas diferentes. De acordo com Anvisa (2017) a validação analítica é definida como a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais que confirmam e fornecem evidências objetivas de que os requisitos específicos para o seu uso pretendido são atendidos.

De acordo com a NBR ISO 9000, a validação é uma forma de comprovar que o método desenvolvido atende aos requisitos de qualidade utilizando-se evidências palpáveis, gerando-se, assim, resultados que podem ser considerados confiáveis para o uso pretendido (EURACHEM, 2014).

A RDC 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre a validação de métodos analíticos aplicados à insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos sendo, portanto utilizado como referência para o presente trabalho. Os parâmetros a serem considerados em uma validação analítica dependem do ensaio a ser realizado, sendo apresentados no Quadro 2 (p. 19) (ANVISA, 2017).

Para metodologias apresentadas em compêndios oficiais reconhecidos pela Anvisa não é necessário a realização de uma validação analítica completa, podendo ser demonstrada sua adequabilidade por meio de uma validação parcial, também denominada de verificação. Isso porque o método já foi previamente validado, sendo necessária apenas uma confirmação de adequabilidade. Assim apenas alguns parâmetros são avaliados, como precisão, exatidão e seletividade (ANVISA, 2017; EURACHEM, 2014).

Quadro 2 – Parâmetros considerados na validação analítica

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetitividade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽¹⁾	Não	Sim
Seletividade ⁽²⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não ⁽³⁾	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

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

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

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: Anvisa (2017)

2.3.1 Linearidade

A linearidade de um método pode ser descrita como a capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de trabalho. Tal parâmetro também está relacionado à sensibilidade, que seria a mudança da concentração do analito que causa uma mudança na resposta, ou seja, é a inclinação da reta. Assim, o método é mais sensível quando pequenas variações são capazes de causar grandes alterações na resposta analítica (INMETRO, 2020; LEE, HALL, 2009; STULZER, TAGLIARI, SILVA, 2006).

Para a determinação da linearidade são necessários, no mínimo, cinco níveis de concentrações diferentes e igualmente distribuídas. Além disso, o teste deve ser realizado em, no mínimo, triplicata, preparadas de maneira independente (ANVISA, 2017).

Para avaliação desse parâmetro, não apenas inspeções visuais gráficas da concentração do analito em função da resposta devem ser feitas, como também inspeção do gráfico de distribuição de resíduos, avaliação do coeficiente de correlação de Pearson (r) e de determinação (R^2), apresentação da equação da reta de regressão, entre outros testes estatísticos. Os testes estatísticos realizados incluem: avaliação de valores discrepantes, análise de normalidade, análise de homocedasticidade para garantir a utilização do modelo correto e análises estatísticas dos resíduos. Além disso, o coeficiente de correlação deve ser maior que

0,99 e deve-se utilizar um nível de significância (α) de 5% nos testes estatísticos (ANVISA, 2017).

Outro teste estatístico importante é o que diz respeito à adequação ao modelo, visto que alguns métodos não apresentam comportamento linear, independente das mudanças propostas. Nesses casos, o comportamento pode ser demonstrado por meio de outro modelo que relacione a concentração do analito e a resposta adquirida, como, por exemplo, uma regressão polinomial (INMETRO, 2020). O modelo linear é preferível devido à destreza e simplicidade matemática, sendo mais fácil a percepção de respostas anômalas. Porém, outro modelo pode ser utilizado desde que seja adequado ao método e que um maior número de padrões seja utilizado (SKOOG, 2008).

2.3.2 Seletividade

A seletividade é avaliada pela capacidade do método de identificar e quantificar o analito de interesse mesmo com a presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, interferentes, componentes da matriz, entre outros (STULZER, TAGLIARI, SILVA, 2006).

Se os componentes presentes na matriz possuem a capacidade de alterar a resposta analítica, a linearidade, precisão e exatidão do método serão seriamente comprometidas, visto que interferem no desempenho da medição. É importante ressaltar que a magnitude desse efeito depende da concentração do interferente, sendo necessária a realização de um estudo para assegurar a seletividade (INMETRO, 2020). Tal parâmetro pode ser estudado a partir da inserção de componentes interferentes e do estudo da resposta desta amostra. Os interferentes introduzidos são, geralmente, aqueles que possivelmente estarão presentes na amostra (EURACHEM, 2014).

2.3.3 Precisão

A precisão pode ser determinada como a proximidade entre os resultados obtidos de uma mesma maneira, ou seja, a reprodutibilidade de medidas obtidas por meio das mesmas condições experimentais. A repetição promove a quantificação do erro através de todas as variações operacionais que podem ocorrer durante as análises de rotina, promovendo um conhecimento da variabilidade do método. Assim a precisão é capaz de refletir os erros aleatórios de uma análise (CARRERA, 2021; EURACHEM, 2014; SKOOG, 2008).

Existem três formas de avaliar a precisão de um método, através da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, todas expressas a partir do desvio padrão relativo (DPR) entre as medidas avaliadas, calculado pela Equação 1 (CARRERA, 2021; SILVA, 2019).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Sendo:

DP: desvio padrão amostral

CMD: concentração média determinada

A repetitividade é determinada pela variação entre as medidas realizadas nas mesmas condições, ou seja, por um mesmo analista, utilizando-se os mesmos equipamentos e no mesmo período. A precisão intermediária avalia como pequenas mudanças nas condições operacionais afeta a variabilidade do resultado, ou seja, como a mudança de tempo, analistas e equipamentos afetam o resultado analítico. Assim, para avaliar tal parâmetro são necessários dois analistas e dois dias diferentes, além de, se possível, equipamentos diferentes. É importante ressaltar que a precisão intermediária é a que mais representa a rotina laboratorial. Por fim, a reprodutibilidade é um parâmetro que avalia a mudança de laboratórios, sendo realizada em locais diferentes, sendo a mais dificilmente encontrada em trabalhos de validação (INMETRO, 2020; SILVA, 2019).

Segundo Anvisa (2017), a precisão deve ser avaliada por meio da repetitividade e da precisão intermediária ou reprodutibilidade, sendo que as amostras devem ser preparadas de maneira independentes. Além disso, tal parâmetro deve ser avaliado a partir de 9 determinações, 3 em cada nível de concentração sendo eles baixo, médio e alto ou 6 determinações a 100% da concentração esperada para o analito.

Como Anvisa (2017) não estabelece critérios para a precisão, mas, sim, diz que os critérios devem ser definidos de acordo com o objetivo e a variabilidade intrínseca do método, a concentração de trabalho e a concentração do analito na amostra, os critérios de aceitação para a precisão do método validado no presente trabalho foram determinados pela AOAC *International* (2012). A Tabela 2 (p. 22) apresenta os critérios de aceitação para precisão de acordo com as diferentes concentrações do analito na amostra.

Tabela 2 – Critérios de aceitação para precisão

Analito (%)	Fração mássica	Unidade	RSD (%)
100	1	100%	1,3
10	10 ⁻¹	10%	1,9
1	10 ⁻²	1%	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg kg ⁻¹)	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg kg ⁻¹)	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg kg ⁻¹)	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg kg ⁻¹)	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg kg ⁻¹)	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg kg ⁻¹)	30

Fonte: AOAC *International* (2012)

De acordo com a Tabela 2 e com a faixa de concentração da amostra se estendendo desde 1 µg mL⁻¹ a 10 µg mL⁻¹, na escala apresentada, o desvio padrão aceitável para o presente trabalho é de 7,3% para repetitividade e de 11% para a precisão intermediária, considerando-se que a dispersão de resultados em condições diferentes tende a ser maior.

2.3.4 Exatidão

A exatidão de um método, também chamada de tendência, está relacionada com sua capacidade de gerar um resultado próximo de um valor dito como verdadeiro. As formas mais comuns de conduzir os ensaios de exatidão são através da utilização de materiais de referência certificados (MRC), em que o valor dado pelo certificado do material é reconhecido como verdadeiro e o resultado obtido deve estar próximo, ou seja, dentro de um intervalo de confiança. A outra forma é através de ensaios de recuperação, em que quantidades conhecidas do analito são adicionadas as amostras e a exatidão é calculada pela recuperação desta quantidade adicionada. (LEMOS, 2016; SANTOS, 2012).

A exatidão deve ser comprovada a partir de 9 determinações, sendo 3 para cada nível de concentração, alto, médio e baixo, realizando-se cada nível em triplicata, estendendo-se por toda faixa da curva de calibração proposta. Além disso, as soluções devem ser preparadas de maneira independente (ANVISA, 2017). Geralmente as concentrações alta, média e baixa são

escolhidas tanto para a precisão quanto para a exatidão, sendo os dois ensaios realizados em conjunto.

Da mesma forma como foi apresentado para a precisão, Anvisa (2017) não estabelece critérios para a recuperação aceitável nos ensaios de exatidão, podendo ser determinado de acordo com as justificativas apresentadas anteriormente. Assim, os critérios também foram determinados pela AOAC *International*, relacionando-se a faixa de concentração do analito na amostra, de acordo com a Tabela 3 (AOAC *INTERNATIONAL*, 2012).

De acordo com a Tabela 3, e considerando-se a faixa de concentração do presente trabalho, o critério de aceitação da recuperação para o parâmetro de exatidão é de 80% a 110%.

Tabela 3 – Critérios de aceitação para exatidão

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

Fonte: AOAC *International* (2012)

2.3.5 Limite de detecção

O limite de detecção pode ser descrito como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não, necessariamente, quantificada, através das condições estabelecidas pelo método. Pode ser definido também como a mínima concentração obtida, sendo ela diferente de zero com 95% a 99% de confiabilidade (INMETRO, 2020, SANTOS, 2012). Tal parâmetro não é considerado robusto, podendo ser alterado por pequenas modificações no sistema, como parâmetros instrumentais, pureza de reagentes ou temperatura (CARRERA, 2021).

O limite de detecção pode ser obtido de duas maneiras diferentes. A primeira leva em consideração a razão sinal/ruído, sendo necessária à justificativa e demonstração de seu cálculo.

Além disso, a razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 2:1. A segunda forma utiliza-se os parâmetros da curva analítica e pode ser calculado pela Equação 2 (ANVISA, 2017).

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo:

IC: inclinação da curva de calibração

σ : desvio padrão

O desvio padrão apresentado pela Equação 2 pode ser calculado de três maneiras: a) a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo vertical, desde que três curvas de calibração sejam utilizadas com concentrações próximas ao limite de detecção suposto; b) utilizar a estimativa do ruído calculado por determinações de uma quantidade suficiente de brancos; c) por meio do desvio padrão residual da linha de regressão (ANVISA, 2017).

2.3.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação pode ser determinado como a menor concentração do analito que o método é capaz de quantificar com precisão e exatidão aceitáveis (SILVA, 2019).

Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação também pode ser obtido das duas maneiras apresentadas, porém a razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 10:1 e, para os parâmetros da curva analítica pode ser calculado pela Equação 3 (ANVISA, 2017).

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC} \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo:

IC: inclinação da curva de calibração

σ : desvio padrão

O desvio padrão apresentado pela Equação 3 pode ser calculado de três maneiras. a) a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo vertical, desde que três curvas de calibração sejam utilizadas com concentrações próximas ao limite de detecção suposto; b) utilizar a estimativa do ruído calculado por determinações de uma quantidade suficiente de brancos; c) obtido por meio do desvio padrão residual da linha de regressão (ANVISA, 2017).

2.3.7 Robustez

O parâmetro robustez é considerado opcional por alguns compêndios oficiais e obrigatório por outros. Porém a sua importância está ligada a conhecer as variáveis do método e como elas interferem na análise como um todo, podendo ser útil no aparecimento de problemas durante a rotina dos ensaios (SANTOS, 2012; STULZER, TAGLIARI, SILVA, 2006).

A robustez apresenta a capacidade de um método em resistir a variações nas condições analíticas, sendo um método robusto aquele que possui uma sensibilidade insignificante a pequenas variações que possam vir a ocorrer durante a execução do método (SILVA, 2019).

De acordo com Anvisa (2017), caso exista alguma variação significativa no método, as condições devem ser controladas por meio de precauções descritas no método. Assim, não haverá interferência desta condição durante as análises. A EURACHEM (2014) afirma que a robustez é capaz de indicar a confiança do método durante sua aplicação na rotina.

Um dos métodos recomendados pela INMETRO (2020) para estudo da robustez é o planejamento de *Youden* que fornece uma ideia de qual variável influencia o resultado e qual tipo de influência ela produz. Assim são realizados oito experimentos com mudanças em sete variáveis importantes para a realização do método e, caso o resultado seja satisfatório, a variável pode ser incorporada no método (RIBANI *et al.*, 2004).

2.3.8 Validação de limpeza

Validação de limpeza é definida como um procedimento documentado que evidencia a eficácia do processo de limpeza de um ou mais equipamentos garantindo-se que os resíduos restantes estejam a níveis aprovados pela legislação vigente. Assim, a validação de limpeza é uma das melhores maneiras de evitar contaminação cruzada, principalmente em linhas produtivas utilizadas para fabricação de diferentes produtos (ANDRADE, 2012).

Para realização de uma validação de limpeza, o guia relacionado à garantia de qualidade da Anvisa preconiza que uma validação de método deve ser estabelecida para o procedimento de análise e um método de amostragem é necessário para verificação da recuperação. O contexto da validação foi abordado nos subtópicos anteriores sendo necessário, dependendo do caso, testar as figuras de mérito apresentadas. Já a amostragem é feita a partir de testes de recuperação das amostras, ou seja, para avaliar a limpeza deve-se conseguir recuperar uma amostra contendo o analito de interesse, que será analisado pelo método validado anteriormente. A amostragem pode ser através da rinsagem ou da amostragem direta na superfície (*swab*) (ANVISA, 2006).

A escolha do método de amostragem deve ser justificada, além de suportar o uso pretendido do estudo. O método de amostragem direta utiliza os *swabs* para recuperação do analito baseando-se em forças físicas e químicas, mas deve ser utilizado com cautela, visto que apenas alguns locais do equipamento são amostrados, devendo-se conhecer sobre a representatividade da área escolhida. Para tal método é desejável uma recuperação de, no mínimo, 75%. Já no processo de rinsagem faz-se uma lavagem do equipamento e a água de lavagem é analisada, não sendo um método direto, porém toda área da superfície é amostrada (ANVISA, 2006; SOUSA, 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento utilizado para realização do presente trabalho está descrito a seguir iniciando-se com uma apresentação dos reagentes utilizados, em seguida o método que está sendo validado e, por fim, os procedimentos para sua validação.

3.1 Reagentes, materiais e equipamentos

Os reagentes utilizados foram: a) cloreto de sódio, marca Supelco, lote K51809104, fabricado em 06/11/2019, válido até 30/11/2024; b) sulfato de amônio, marca Scharlau, lote 17695002, fabricado em 02/01/2017, válido até 30/01/2022; c) hidróxido de sódio, marca Merck, lote B1681098, fabricado em 05/04/2019, válido até 30/04/2022; d) kit Micro BCA para análise de proteína, marca Thermo Fisher Scientific, lote VF305041, validade até 31/12/2039.

Por sua vez, os materiais e equipamentos utilizados foram: a) microplacas de 96 poços, marca Perkin Elmer; b) leitora de microplacas, marca Perkin Elmer e c) estufa, marca POL-EKO.

3.2 Método a ser validado

No presente trabalho realizou-se a validação do método micro BCA para determinação de proteínas em equipamentos da linha produtiva de soros hiperimunes da Fundação Ezequiel Dias. As condições do método estão apresentadas neste tópico a partir do preparo de soluções e do procedimento de análise.

3.2.1 Preparo das soluções

A) Preparo da solução salina 0,9% m v⁻¹

Inicialmente foram transferidos 9,0000 g de cloreto de sódio para um béquer de 1 L e, utilizando-se 500 mL de água purificada, transferiu-se o conteúdo quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L, completando-se o volume com água purificada.

B) Diluições do padrão de albumina para a curva de calibração

Realizou-se a diluição do padrão de albumina do kit micro BCA para uma solução intermediária adicionando-se 750 µL da solução concentrada de albumina (2000 µg mL⁻¹) em um balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com solução salina (300 µg mL⁻¹). A partir da solução intermediária, fez-se dez soluções acrescentando-se os volumes apresentados na Tabela 4 em balões volumétricos de 5,00 mL e completando-se o volume com a solução salina.

Tabela 4 – Preparo das diluições de albumina para a curva de calibração

Balão	Volume da solução de albumina (μL)	Concentração final de albumina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	36	2,122
2	106	6,381
3	176	10,58
4	246	14,78
5	316	18,97
6	386	23,17
7	456	27,37
8	526	31,57
9	597	35,77
10	667	40,02

Fonte: Fundação Ezequiel Dias (2021b)

C) Preparo da solução de trabalho

Para o preparo da solução de trabalho (WR) calculou-se a quantidade necessária considerando-se a quantidade de poços em utilização para cada análise e a quantidade de WR necessário em cada poço. Para o procedimento de análise descrito necessita-se de 150 μL de volume por poço. Assim, para calcular, por exemplo, a quantidade de reagente WR necessário para a curva de calibração basta multiplicar 150 μL por 10 poços em utilização, demandando-se 1500 μL .

Após o cálculo, o WR foi preparado adicionando-se os reagentes MA, MB e MC do kit em sequência com uma proporção de 50:48:2. Assim, para o exemplo citado, realizou-se a adição de 750 μL de MA, 720 μL de MB e, por fim, 30 μL de MC. Vale ressaltar que quando o reagente MC é adicionado aos reagentes MA e MB a solução fica turva, porém, após a homogeneização, a turbidez desaparece gerando uma solução verde límpida.

3.2.2 Procedimento de análise

Para o procedimento de análise utilizou-se uma microplaca de 96 poços com tampa. Identificaram-se os poços que receberam amostras e padrões na superfície da tampa da microplaca e pipetou-se 150 μL dessas soluções em seus respectivos poços. Em seguida, adicionou-se 150 μL do WR nos poços em utilização, tampando-se a microplaca com o auxílio de um parafilme e, em seguida, com a própria tampa. Agitou-se a microplaca na leitora por 30

segundos e incubou-se em estufa a 37°C por duas horas. Após o período de incubação, a microplaca foi retirada e aguardou-se até que sua temperatura se igualar à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. Por fim, os dados de absorbância foram adquiridos com o auxílio da leitora de microplacas ($\lambda = 562 \text{ nm}$).

3.3 Validação analítica

Para realização da validação analítica foram testados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez, sendo as análises estatísticas dos parâmetros realizadas com o software R (x64 3.6.3).

3.3.1 Linearidade

Para avaliar o parâmetro de linearidade foram construídas cinco curvas de calibração, preparando-se uma solução intermediária com a adição de 3750 μL do padrão de albumina do kit (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em um balão volumétrico de 5,00 mL e completando-se o volume com a solução salina. A partir desta solução (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fez-se as diluições apresentadas na Tabela 4 (p. 28) de maneira independente e o procedimento de análise foi feito como indicado no item 3.2.2 (p. 28).

Para realização dos testes estatísticos verificou-se inicialmente a presença de valores *outliers* utilizando o teste do resíduo padronizado de *Jackknife*, em que no máximo 22% dos valores originais podem ser retirados. Em seguida, avaliou-se a normalidade pelo teste de *Ryan-Joiner*, a independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson*, a homocedasticidade dos resíduos pelo teste de *Breush-Pagan*, análise da curva de calibração pelo teste ANOVA, a adequação ao modelo e os coeficientes de regressão, que devem ser maiores que 0,99 (ANVISA, 2017). Com exceção da análise dos coeficientes de regressão, para aceitação dos testes estatísticos o valor p deve ser maior que 0,05 (não rejeição da Hipótese nula).

3.3.2 Seletividade

Para avaliar o parâmetro de seletividade foi testada a presença de hidróxido de sódio, utilizado na limpeza dos equipamentos da linha produtiva de soros hiperimunes, e sulfato de amônio, utilizado na produção desse soro, como apresentado nos itens 2.1.3 (p. 10) e 2.2 (p. 12).

O critério de aceitação da seletividade foi escolhido como sendo igual ao da exatidão. Assim, a recuperação da amostra, em relação ao padrão da curva de calibração de concentração igual ($18,97 \mu\text{g mL}^{-1}$), deve estar entre 80% a 110%.

A) Preparo da solução de sulfato de amônio 0,6% m v⁻¹

Mediu-se 60,00 mg de sulfato de amônio e, com o auxílio de 5 mL água purificada, transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com água purificada.

B) Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L

Utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio mais concentrada ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), adicionando-se 500 μL dessa solução em um balão volumétrico de 5,00 mL e completando-se o volume com água purificada.

C) Procedimento de análise

Esse procedimento foi realizado em concomitância com a linearidade, assim, não foi necessária a construção de uma curva de calibração. Preparou-se as amostras adicionando-se 316 μL de solução de albumina ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$), 250 μL da solução de sulfato de amônio 0,6% m v⁻¹ e 23 μL da solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com solução salina. Procedeu-se, então, com o procedimento de análise apresentado no item 3.2.2 (p. 28).

Para o cálculo da recuperação da amostra utilizou-se a primeira curva da linearidade como curva de calibração, prevendo a concentração de albumina nas amostras. Em seguida um teste de *outliers* (*teste de Grubs*) foi aplicado ao conjunto de dados das amostras, para certificar se havia presença de valores discrepantes. Os pontos das outras quatro curvas da linearidade, correspondentes à concentração de $18,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ponto 5), foram comparadas às amostras para obtenção da recuperação e, por fim, a apresentou-se a média das recuperações.

3.3.3 Precisão e exatidão

Para realização dos parâmetros de exatidão e precisão, três níveis de concentração foram escolhidos, sendo o nível baixo, médio e alto, respectivamente, $2,122 \mu\text{g mL}^{-1}$, $18,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $40,02 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a realização dos testes foi construída uma curva de calibração conforme o item 3.2.1 (p. 27) e os pontos correspondentes aos níveis baixo, médio e alto foram elaborados em triplicata. O procedimento de análise está evidenciado no item 3.2.2 (p. 28).

Assim, as análises foram realizadas no laboratório do controle físico-químico da FUNED em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes. Vale ressaltar que no laboratório não havia a presença de duas leitoras de microplacas, portanto não foi possível alternar os equipamentos.

Os critérios de aceitação dos parâmetros de precisão e exatidão são dependentes da faixa de concentração do método, como já foi mencionado nos itens 2.3.3 (p. 20) e 2.3.4 (p. 22). Assim, como a faixa de trabalho se estende entre, aproximadamente, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, abrange as faixas de 1 a 10 mg L^{-1} da Tabela 2 (p. 22) e da Tabela 3 (p. 23), o critério de aceitação para a exatidão foi estabelecido para recuperações entre 80% a 110%. Já para a precisão intermediária, aceita-se um DPR de, no máximo, 11%, enquanto, para a repetitividade, o critério de aceitação é dois terços do critério da precisão intermediária, sendo 7,3%. Vale ressaltar que, antes da avaliação do DPR, foi necessário comprovar que os resíduos seguem uma distribuição normal e são homocedásticos utilizando-se os mesmos testes da linearidade.

3.3.4 Limites de detecção e quantificação

Para calcular os limites de detecção e quantificação do método apresentado foram utilizados os dados das curvas de calibração do ensaio de linearidade aplicados nas equações 2 (p. 24) e 3 (p. 24). Vale ressaltar que o cálculo foi feito a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo vertical, como apresentado nos itens 2.3.5 (p. 23) e 2.3.6 (p. 24).

3.3.5 Robustez

Para avaliar o parâmetro de robustez utilizou-se o teste de *Youden Steiner*, onde foram testadas sete variáveis em oito experimentos conforme o

Quadro 3 (p. 32).

As variáveis avaliadas no trabalho em questão foram tempo de incubação, temperatura de incubação, comprimento de onda, volume de reagente de trabalho (WR), volume de amostra, proporção do reagente MC no WR e tempo de agitação. A dição distinta de experimento.

Tabela 5 (p. 32) indica essas variáveis e seus limites inferior e superior.

Quadro 3 – Matriz de ensaios codificados do teste de robustez de acordo com *Youden Steiner*

Variável	Análise							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	A
B,b	B	B	b	b	B	B	b	B
C,c	C	c	C	c	C	c	C	C
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Fonte: Fundação Ezequiel Dias (2021b)

Assim, com a utilização do

Quadro 3 e da dição distinta de experimento.

Tabela 5 foi possível criar o Quadro 4 (p. 33) que resume as análises do parâmetro de robustez, sendo cada coluna uma condição distinta de experimento.

Tabela 5 – Fatores e níveis para o teste de robustez

Variável		Limites inferior e superior
A	Tempo de incubação	1 hora
		3 horas
B	Temperatura de incubação	32°C
		43°C
C	Comprimento de onda	542 nm
		582 nm
D	Volume de WR	130 µL
		170 µL
E	Volume de amostra	130 µL
		170 µL
F	Proporção do reagente MC no preparo de WR	1%
		3%
G	Tempo de agitação da microplaca	15 segundos
		45 segundos

Fonte: Fundação Ezequiel Dias (2021b)

Assim, escolheu-se a concentração de 18,97 µg mL⁻¹ para testar as condições descritas no Quadro 4, visto que é a concentração média da curva de calibração, sendo aplicado ao procedimento de análise descrito no item 3.2.2 (p. 28). O experimento foi realizado em duplicata e foi aplicado testes de variância utilizando-se o software R para obtenção do resultado.

Quadro 4 – Matriz de ensaios do teste de robustez

1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de incubação: 3 h	Tempo de incubação: 1 h						
Temperatura de incubação: 43 °C	Temperatura de incubação: 43 °C	Temperatura de incubação: 32 °C	Temperatura de incubação: 32 °C	Temperatura de incubação: 43 °C	Temperatura de incubação: 43 °C	Temperatura de incubação: 32 °C	Temperatura de incubação: 32 °C

Comprimento de onda: 582 nm	Comprimento de onda: 542 nm	Comprimento de onda: 582 nm	Comprimento de onda: 542 nm	Comprimento de onda: 582 nm	Comprimento de onda: 542 nm	Comprimento de onda: 582 nm	Comprimento de onda: 542 nm
Volume de WR: 170 µL	Volume de WR: 170 µL	Volume de WR: 130 µL	Volume de WR: 170 µL	Volume de WR: 170 µL			
Volume de amostra: 170 µL	Volume de amostra: 130 µL	Volume de amostra: 170 µL	Volume de amostra: 130 µL	Volume de amostra: 130 µL	Volume de amostra: 170 µL	Volume de amostra: 130 µL	Volume de amostra: 170 µL
Proporção do reagente MC no WR: 3	Proporção do reagente MC no WR: 1	Proporção do reagente MC no WR: 1	Proporção do reagente MC no WR: 3	Proporção do reagente MC no WR: 3	Proporção do reagente MC no WR: 1	Proporção do reagente MC no WR: 1	Proporção do reagente MC no WR: 3
Tempo de agitação: 45 s.	Tempo de agitação: 15 s.	Tempo de agitação: 15 s.	Tempo de agitação: 45 s.	Tempo de agitação: 15 s.	Tempo de agitação: 45 s.	Tempo de agitação: 45 s.	Tempo de agitação: 15 s.

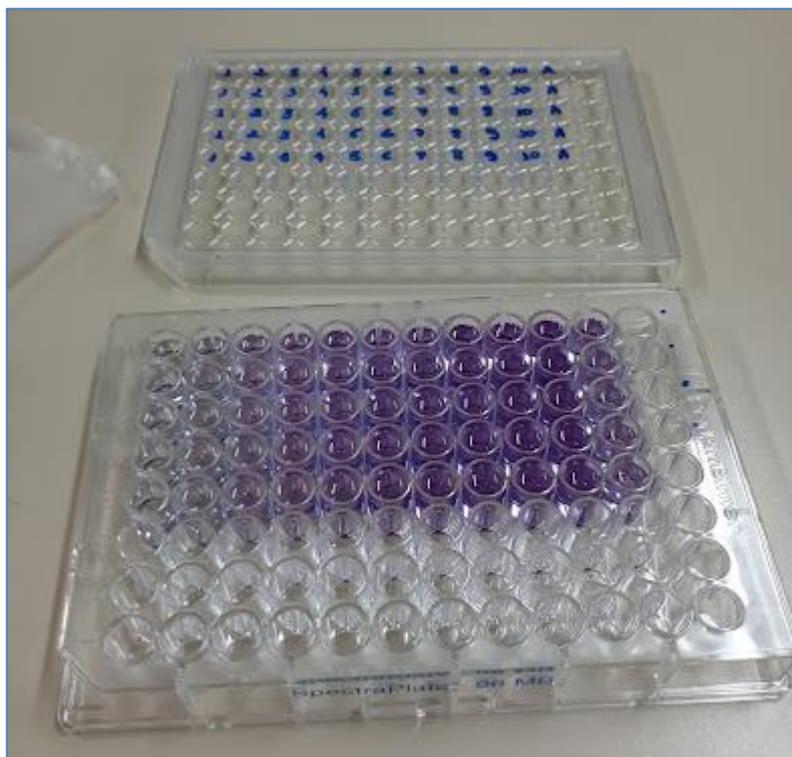
Fonte: Fundação Ezequiel Dias (2021b)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Linearidade

Para o teste de linearidade foram feitas 5 curvas com 10 pontos cada uma, totalizando 50 pontos. A Figura 4 mostra o resultado visual do teste, sendo possível perceber que as colorações dos pontos aumentam à medida que a concentração também aumenta. Já a Tabela 6 (p. 35) apresenta os resultados das absorbâncias de cada ponto das cinco curvas de calibração.

Figura 4 – Resultado visual do teste de linearidade



Fonte: Autoria própria

Tabela 6 – Resultados do teste de linearidade

Ponto	Curva	Nível	Concentração de albumina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância	
1		1	2,122	0,154	
2		2	6,381	0,210	
3		3	10,58	0,286	
4		4	14,78	0,370	
5	1	5	18,97	0,419	
6		6	23,17	0,481	
7		7	27,37	0,525	
8		8	31,57	0,593	
9		9	35,77	0,649	
10		10	40,02	0,714	
11			1	2,122	0,155
12			2	6,381	0,212
13			3	10,58	0,272
14			4	14,78	0,363
15	2	5	18,97	0,417	
16		6	23,17	0,480	
17		7	27,37	0,535	
18		8	31,57	0,586	
19		9	35,77	0,647	
20		10	40,02	0,728	
21			1	2,122	0,168
22			2	6,381	0,203
23			3	10,58	0,266
24			4	14,78	0,366
25	3	5	18,97	0,419	
26		6	23,17	0,489	
27		7	27,37	0,512	
28		8	31,57	0,562	
29		9	35,77	0,625	
30		10	40,02	0,684	

Continua na página seguinte

Tabela 6 – Resultados do teste de linearidade (Continuação).

Ponto	Curva	Nível	Concentração de albumina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância
31		1	2,122	0,149
32		2	6,381	0,220
33		3	10,58	0,279
34		4	14,78	0,357
35	4	5	18,97	0,437
36		6	23,17	0,484
37		7	27,37	0,557
38		8	31,57	0,585
39		9	35,77	0,649
40		10	40,02	0,716
41		1	2,122	0,162
42		2	6,381	0,211
43		3	10,58	0,314
44		4	14,78	0,370
45	5	5	18,97	0,442
46		6	23,17	0,502
47		7	27,37	0,550
48		8	31,57	0,637
49		9	35,77	0,648
50		10	40,02	0,691

Fonte: Autoria própria

4.1.1 Modelo linear

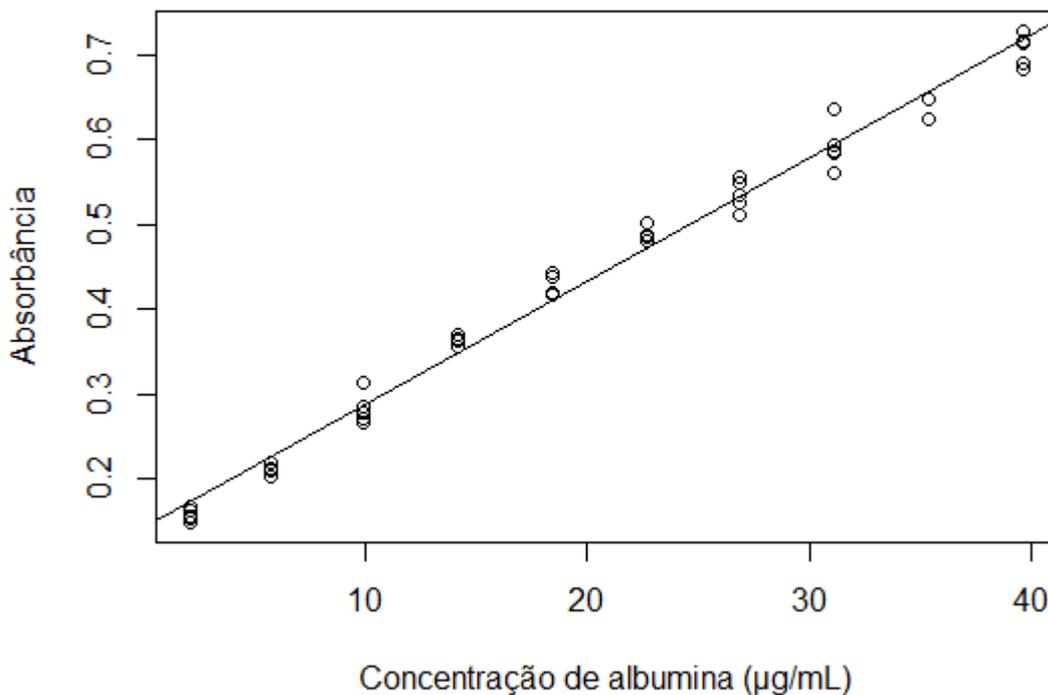
Os dados da

Tabela 6 (p. 35) foram utilizados para elaboração de um regressão linear apresentada pelo Gráfico 7 (p. 37), cujo modelo é ilustrado na Equação 4 (PECK, VINING, MONTGOMERY, 2012).

$$y = ax + b$$

Eq. 4

Gráfico 7 – Dispersão de pontos e modelo de regressão linear aplicados aos dados das soluções padrão



Fonte: Autoria própria

Embora a análise visual do gráfico de regressão seja propensa a erros de interpretação, devido principalmente às características subjetivas desta análise, uma inspeção inicial pode ser utilizada como ferramenta de complementação aos testes estatísticos. A partir do Gráfico 7, não

é evidenciado um ajuste perfeito dos dados ao modelo linear, devido ao número expressivo de valores experimentais menores que os valores previstos pelo referido modelo.

Em seguida, realizou-se o conjunto de análises estatísticas para avaliar o parâmetro linearidade. De modo geral, estabeleceu-se o nível de significância dos testes igual a 5% ($\alpha = 0,05$).

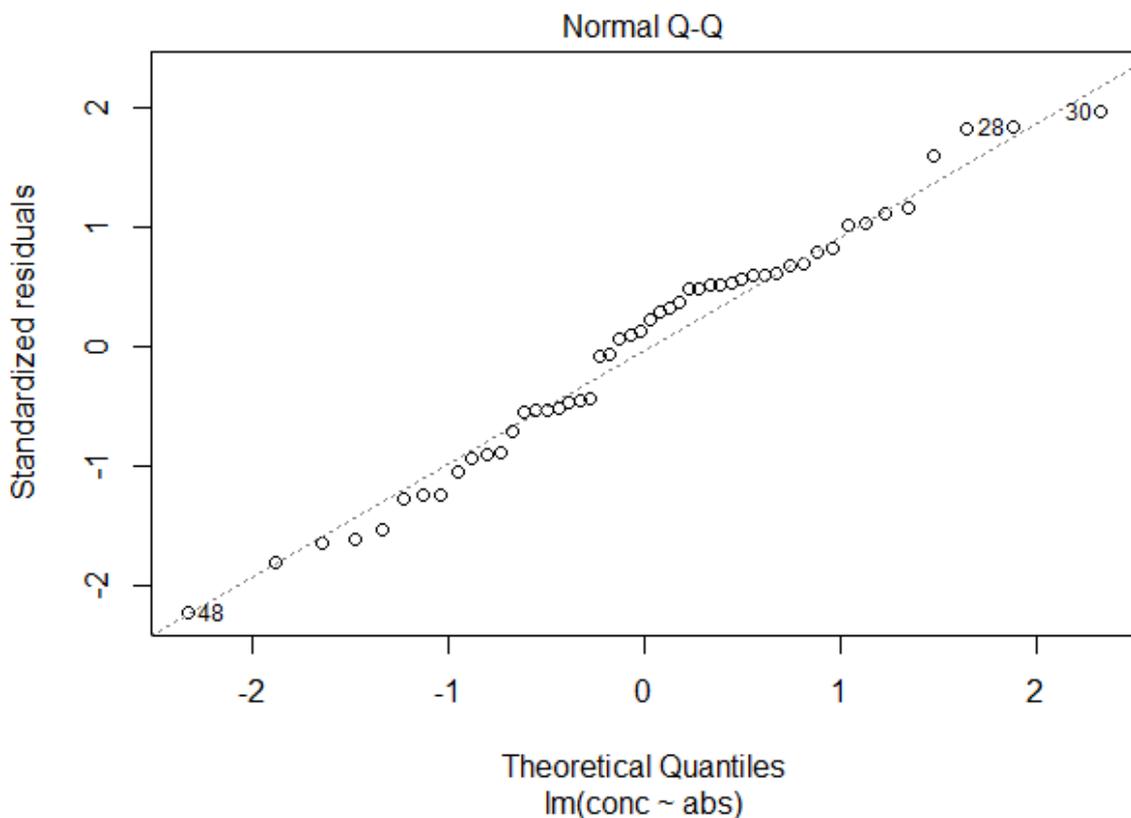
A) Pontos suspeitos e valores outliers

A presença de valores suspeitos foi avaliada pelo teste de resíduos padronizados “*Jackknife*”, sendo possível a retirada de, no máximo, 22% dos valores originais. Para o modelo linear proposto não foi identificada a presença de *outliers*.

B) Análise de normalidade

Para o teste de normalidade utilizou-se o teste estatístico de *Ryan-Joiner* que avalia a correlação entre os resíduos e se eles possuem comportamento normal. O Gráfico 8 apresenta a correlação entre os resíduos.

Gráfico 8 – Correlação entre resíduos da regressão linear



Fonte: Autoria própria

Para este teste, H_0 determina que os resíduos seguem a distribuição normal, de média igual a zero, e a hipótese alternativa (H_a) define que os resíduos não seguem uma distribuição normal. O valor encontrado para o valor p foi igual a 0,4008, maior que o nível de significância estabelecido. Ou seja, com 95% de confiança afirma-se que não há indícios que H_0 deva ser rejeitada.

C) Homocedasticidade

Para verificar a homocedasticidade dos resíduos utilizou-se o teste de *Breush-Pagan* e estabeleceu-se como hipótese nula (H_0) que as variâncias dos resíduos não diferem entre si, ou seja, os resíduos são homocedásticos, e como hipótese alternativa (H_a) que as variâncias dos resíduos são diferentes, ou seja, os resíduos são heterocedásticos.

Visto que o valor p foi igual a 0,1846, maior que o nível de significância estabelecido, com 95% de confiança afirma-se que não há indícios que H_0 deva ser rejeitada.

D) Independência dos resíduos

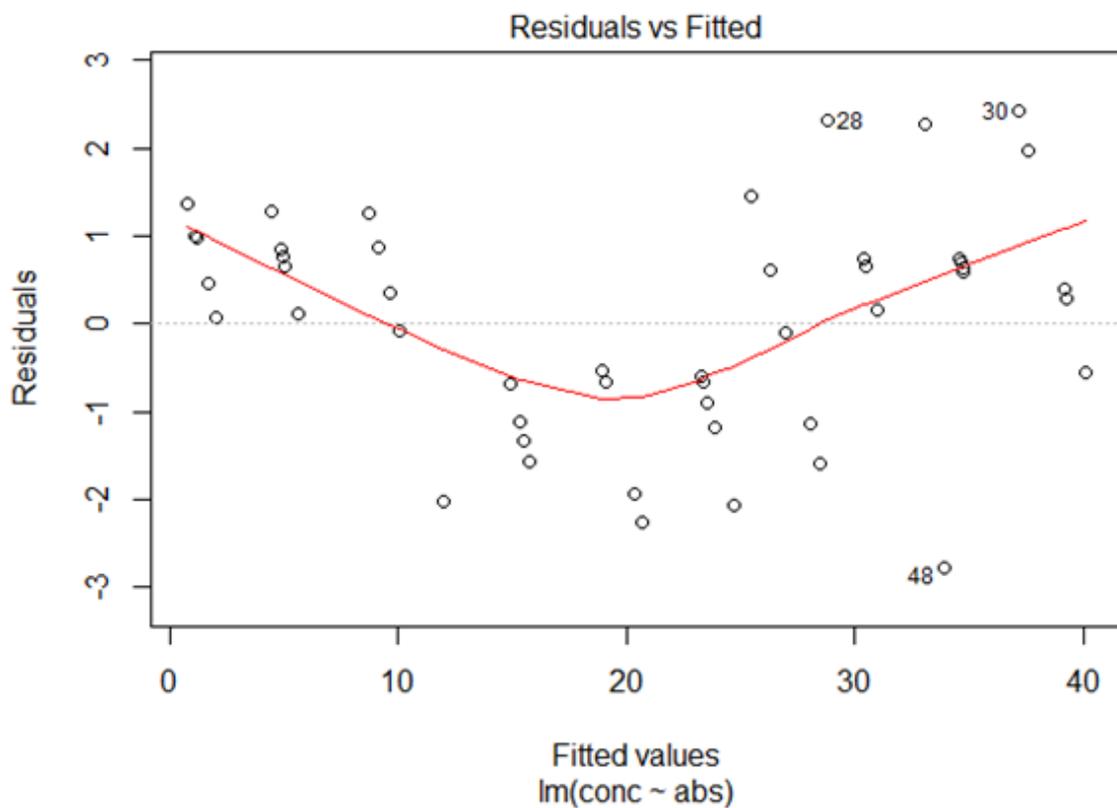
A avaliação da independência dos resíduos estuda a estrutura ou aleatoriedade dos resíduos da regressão, sendo frequentemente aplicado para determinar autocorrelação de primeira ordem. Para isso os resíduos foram submetidos ao teste de *Durbin-Watson*. A hipótese nula (H_0) e hipótese alternativa (H_a) foram identificadas como, respectivamente, os resíduos são independentes, ou seja, não há autocorrelação entre eles e os resíduos são dependentes, havendo autocorrelação entre eles.

O valor encontrado para o valor p foi igual a $1,153 \times 10^{-5}$, menor que o nível de significância. Portanto, com 95% de confiança, afirma-se que H_0 deve ser rejeitada, ou seja, os resíduos não são considerados independentes. Como tem-se autocorrelação dos resíduos, pode-se deduzir, em conjunto com a análise visual do gráfico de regressão linear (Gráfico 7; p. 37), que o modelo linear não seja o mais eficaz para representar os valores experimentais obtidos. O Gráfico 9 (p. 40) representa a distribuição dos resíduos do modelo apresentado e, pode-se perceber um comportamento não aleatório dos resíduos.

Ele apresenta uma linha vermelha que mostra a tendência dos resíduos, percebendo-se através dela, uma tendência de distribuição quadrática, devido à curva que se forma. Em um cenário hipotético e ideal, a linha vermelha deveria ser reta e na altura do zero, apresentando que as

distâncias entre os pontos e a regressão linear são igualmente distribuídas (PECK, VINING, MONTGOMERY, 2012).

Gráfico 9 – Distribuição de resíduos para o modelo linear



Fonte: Autoria própria

E) Análise da qualidade do ajuste linear

Para avaliação da qualidade do ajuste linear, utilizou-se o teste de variância por ANOVA. Primeiramente foi realizado um teste F ($\alpha = 0,05$) para verificar se o coeficiente angular do modelo é igual à zero (H_0) ou diferente de zero (H_a). Como o valor p obtido foi menor que $2,2 \times 10^{-6}$, com 95% de confiança rejeita-se H_0 , indicando que o coeficiente angular não é igual à zero. Em seguida, realizou-se o teste de ajuste ao modelo, cuja H_0 corresponde ao ajuste dos

dados ao modelo linear e H_a indica a falta de ajuste do modelo. Como o valor p foi igual a 0,0008983, menor que o nível de significância ($\alpha = 0,05$), com 95% de confiança rejeitou-se H_0 . Por fim, calculou-se os coeficientes de correlação de Pearson (r) dos dados e de determinação (R^2) do ajuste linear, sendo respectivamente 0,9947 e 0,9894. O valor de ' r ' mostra uma elevada correlação linear entre os dados de concentração e absorvância, mas o valor de R^2 não é ideal para um ajuste linear, por ser menor que 0,99.

De modo geral, a partir dos resultados de inspeção do gráfico de regressão linear (Gráfico 7; p. 37) e dos testes estatísticos, verificou-se que os resíduos são autocorrelacionados, falta de ajuste ao modelo linear e R^2 menor que 0,99. Portanto, infere-se que o modelo linear não é adequado para este método.

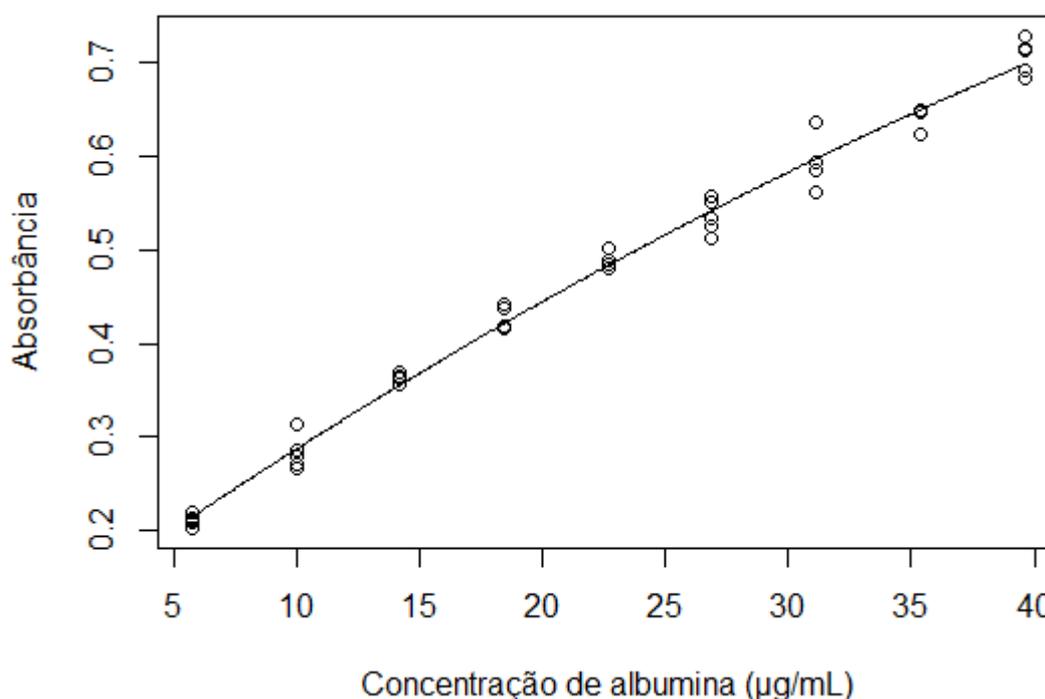
4.1.2 Modelo quadrático

Um modelo quadrático foi proposto como alternativa, porém foi necessária a retirada do nível 1 da curva de calibração devido aos parâmetros de precisão e limite de detecção. Tais motivos serão abordados nos itens 4.3 (p. 47) e 4.4 (p. 50). Assim, utilizando-se os dados da

Tabela 6 (p. 35) e uma regressão polinomial de segundo grau segundo a Equação 5, construiu-se o Gráfico 10 (PECK, VINING, MONTGOMERY, 2012).

$$y = ax^2 + bx + c \quad \text{Eq. 5}$$

Gráfico 10 – Dispersão de pontos e modelo de regressão quadrático aplicados aos dados das soluções padrão



Fonte: Autoria própria

Como abordado anteriormente, a análise visual do gráfico de regressão pode ser utilizada como ferramenta de complementação aos testes estatísticos. A partir do Gráfico 10, é possível inferir um ajuste adequado do modelo polinomial de segundo grau.

Os testes de hipóteses utilizados na avaliação da regressão linear foram aplicados para a avaliação do atual modelo, como evidenciado a seguir:

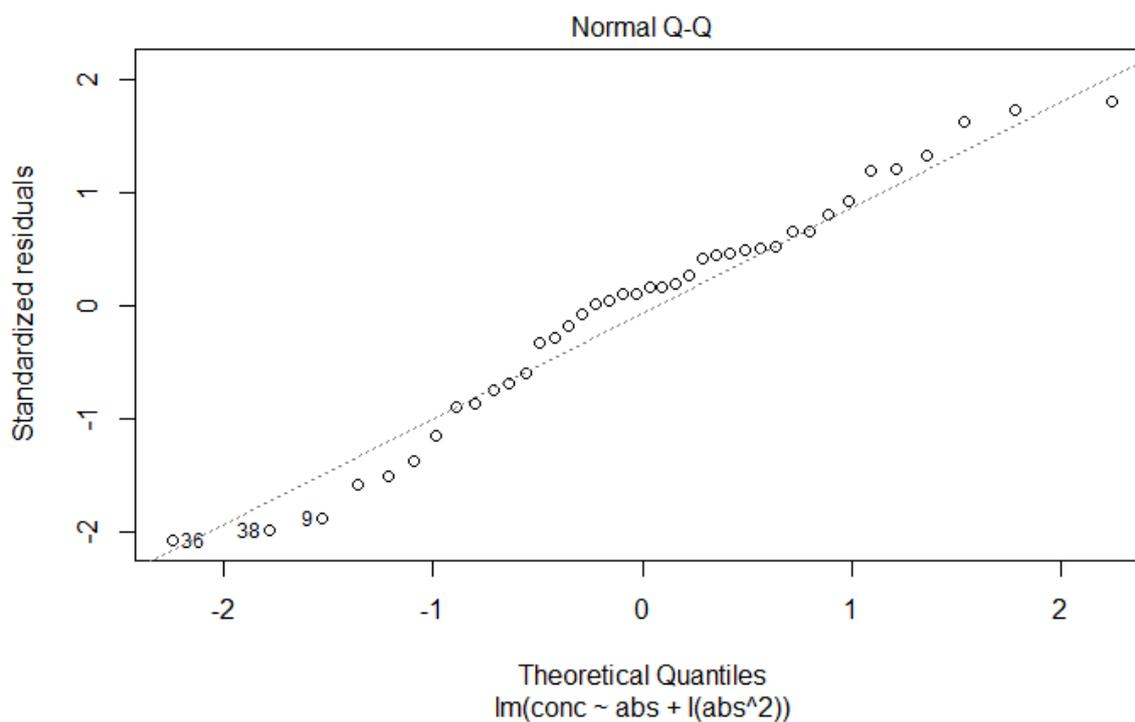
A) Pontos suspeitos e valores outliers

Utilizando-se o teste de resíduos de *Jackknife*, o modelo quadrático proposto apresentou cinco (05) valores *outliers*, sendo os pontos 18, 24, 25, 26 e 43. Como esses valores representam menos que 22% dos valores originais, eles foram retirados do modelo para realização dos testes estatísticos.

B) Análise de normalidade

A partir do teste estatístico de *Ryan-Joiner* foi possível confirmar que os resíduos seguem uma distribuição normal, tendo em vista o valor p igual a 0,3348, maior que o nível de significância. Ou seja, com 95% de confiança não há indícios que H_0 deva ser rejeitada. O Gráfico 11 apresenta a correlação entre os resíduos, onde se pode perceber que visualmente os resíduos seguem distribuição normal, como determinado pelo teste estatístico.

Gráfico 11 – Correlação entre resíduos da regressão quadrática



Fonte: Autoria própria

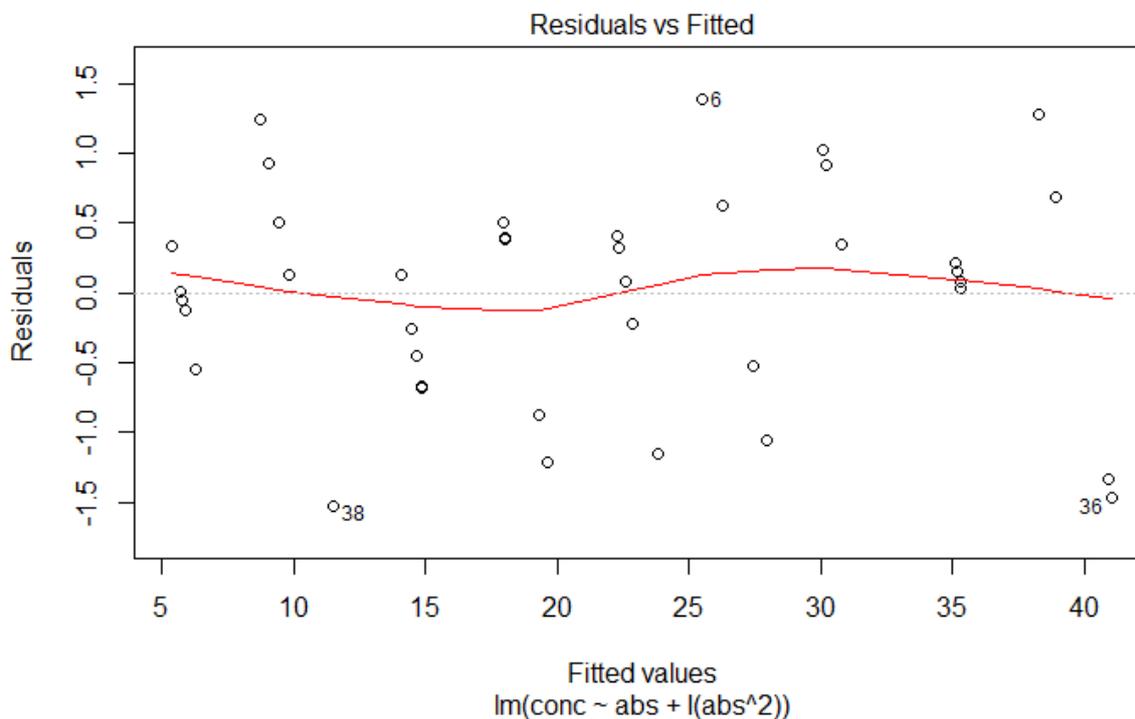
C) Homocedasticidade

O teste estatístico de *Breush-Pagan* estabeleceu que os resíduos são homocedásticos, tendo em vista que, com 95% de confiança, não houve indícios de rejeição de H_0 . Esta afirmação está relacionada ao valor p igual a 0,1638, maior que o nível de significância do teste de hipóteses.

D) Independência dos resíduos

Os resíduos foram submetidos ao teste de *Durbin-Watson* para determinar se eram independentes ou dependentes. O valor p encontrado foi igual a 0,3203, inferindo-se que não há indícios para a rejeição H_0 . Portanto, os resíduos foram caracterizados como independentes. O Gráfico 12 apresenta a distribuição de resíduos para este modelo.

Gráfico 12 – Distribuição de resíduos para o modelo quadrático



Fonte: Autoria própria

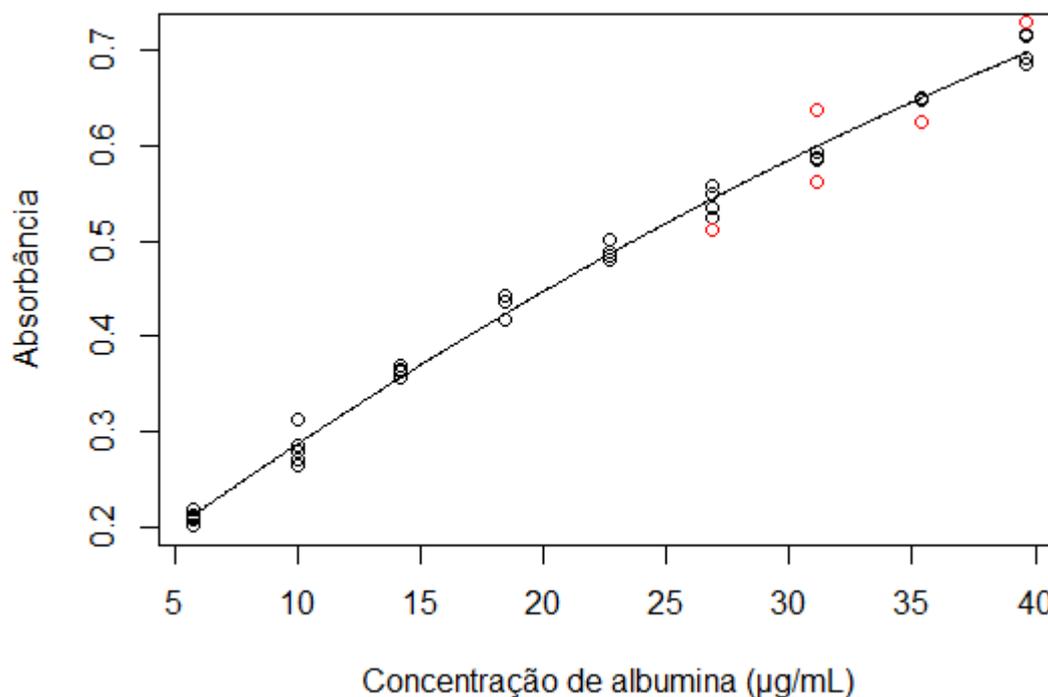
O Gráfico 12 apresenta uma linha vermelha que mostra a tendência dos resíduos, evidenciando uma tendência balanceada, visto que existe, aproximadamente, o mesmo número de pontos dos dois lados da linha e com distâncias semelhantes.

E) Análise da qualidade do ajuste polinomial de segundo grau

Para o teste F, verificou-se que o valor p foi menor que $2,2 \times 10^{-16}$, menor que o nível de significância, indicando que, com 95% de confiança, H_0 deve ser rejeitada, garantindo que o coeficiente de x^2 é diferente de zero. Em seguida, realizou-se o teste de ajuste ao modelo que, devido ao valor p igual a 0,3251, maior que o nível de significância, pôde-se atestar que o ajuste polinomial de segundo grau é adequado. Por fim, ao calcular R^2 (0,9951), verificou-se que o valor é maior que 0,99 indicando que o referido ajuste tem elevada qualidade.

A partir dos resultados de inspeção do gráfico de regressão linear e dos testes estatísticos pode-se inferir que o modelo quadrático é adequado para este método. O Gráfico 13 apresenta o modelo final, sendo que os valores *outliers* retirados do modelo estão representados em vermelho.

Gráfico 13 – Modelo quadrático final



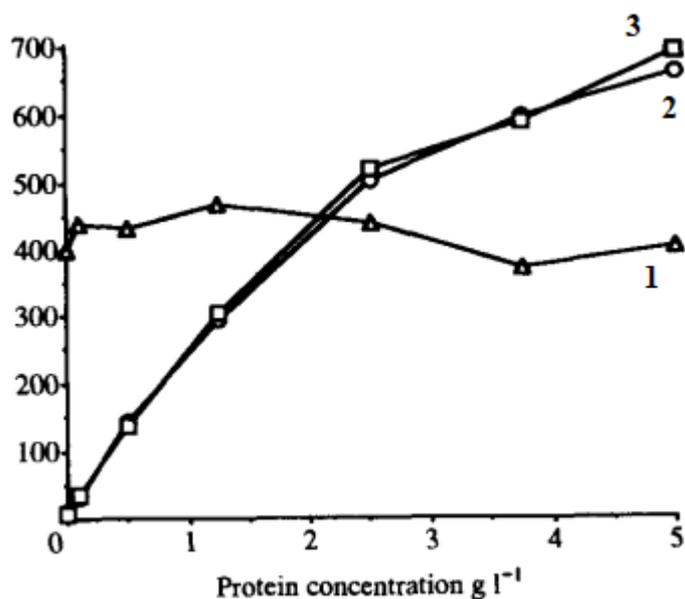
Dados: pontos representados em vermelho são *outliers*.

Fonte: Autoria própria

Através das informações reunidas neste item, pode-se enfatizar que o modelo quadrático é o mais adequado. Para o modelo linear existe uma dependência entre os resíduos, além da não adequação do modelo. Durante a inspeção visual da regressão e da distribuição dos seus resíduos foi possível perceber essa falta de ajuste determinada pelos testes estatísticos. Além disso, a RDC nº 166 de 2017 preconiza que o coeficiente de correlação esteja acima de 0,99, o que não ocorre para o modelo linear. Já o modelo quadrático atende a todos os requisitos dessa resolução, além de ser visualizado um bom ajuste através dos gráficos de regressão e distribuição dos resíduos (ANVISA, 2017).

Osnes *et al.* (1993) apresentou uma validação de método para análise de proteína em bile através da precipitação da proteína e análise pelo método micro BCA e pôde-se observar em seus resultados uma tendência quadrática na curva de calibração, como mostrado no Gráfico 14.

Gráfico 14 - Comparação entre curvas de calibração alterando o tratamento da amostra



Sendo: Protein concentration g l⁻¹ = concentração de proteína (g L⁻¹)

Fonte: Adaptado de Osnes *et al.* (1993)

O Gráfico 14 demonstra três curvas diferentes, cada qual com um tratamento da amostra. A curva 1 foi feita sem a precipitação da proteína, a curva 2 e 3 houve precipitação antes da análise e, a curva 3 passou, ainda, por um processo de lavagem. Esses tratamentos não foram necessários para o presente trabalho devido à diferença nas amostras, na faixa de trabalho e, ainda, no objetivo. Apesar das diferenças mencionadas, as curvas 2 e 3 evidenciam a tendência quadrática do método, como confirmado pelo teste de linearidade apresentado neste item.

4.2 Seletividade

Para avaliar o parâmetro de seletividade, foram preparadas soluções com os possíveis interferentes da análise, a fim de comprovar que o método é seletivo ao analito em questão. Por serem utilizados nos processos de produção de soro hiperimune e limpeza, respectivamente, as soluções aquosas utilizadas foram sulfato de amônio e hidróxido de sódio.

A seletividade foi conduzida em conjunto com o teste de linearidade, assim, os dados da primeira curva de calibração da

Tabela 6 (p. 35) foi utilizada no cálculo das concentrações das amostras, e os outros pontos do mesmo nível de concentração da amostra foram utilizados para comparação, obtendo-se, assim, as recuperações. Os resultados de absorvância e concentração obtidos para as cinco replicatas de amostras e os padrões estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da seletividade

Amostras e padrões	Absorbância	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Amostra 1	0,428	18,6471
Amostra 2	0,358	15,8290
Amostra 3	0,389	16,0797
Amostra 4	0,393	16,3832
Amostra 5	0,400	16,7861
Padrão 1	0,417	19,0415
Padrão 2	0,419	19,1772
Padrão 3	0,437	20,3984
Padrão 4	0,442	20,7377

Fonte: Autoria própria

Para determinar se existe a presença de *outliers*, foi realizado um teste de “*Grubbs*” ($\alpha = 0,05$) utilizando o programa R. Para a avaliação deste teste, a hipótese nula (H_0) “Não há *outliers*” é aceita caso o valor p seja maior ou igual a 0,05. Após o processamento dos dados, obteve-se valor p igual a 0,0372, indicando que, com 95% de confiança, H_0 deve ser rejeitada. O teste de “*Grubbs*” identificou a presença de um valor *outlier*, proveniente da amostra 01. Após a retirada deste valor, uma nova testagem foi realizada obtendo valor p igual a 0,3318, ou seja, com 95% de confiança, não há indícios que H_0 deva ser rejeitada (ausência de *outliers*).

Considerando-se que Anvisa (2017) não estabelece critérios para a seletividade, o critério de aceitação deste parâmetro foi escolhido como sendo entre 80% e 110%, conforme o parâmetro de exatidão. A recuperação média das amostras em relação aos padrões foi igual a 88,28%, atendendo aos critérios de aceitação.

O critério escolhido pode ser justificado pelas substâncias interferentes no método de BCA e micro BCA, sendo, um deles, o sulfato de amônio. Tal substância pode gerar um resultado falso

negativo, ou seja, pode reduzir a concentração de proteína encontrada na amostra, sendo justificado pela modificação do pH. Assim, já era esperada uma recuperação mais baixa. Considerando-se que a validação proposta é de limpeza de equipamentos de produção de soro hiperimune, acredita-se que não exista mais a presença do sulfato de amônio em concentrações suficientes para interferir no teste. Como a seletividade atendeu ao critério escolhido, o método foi considerado apto para determinação de proteínas na finalidade pretendida (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998).

4.3 Precisão e exatidão

Os dados dos estudos de precisão e exatidão, considerando o primeiro dia, foram obtidos a partir do teste de linearidade, sendo a primeira curva considerada como curva de calibração e as demais como amostras. Assim, foi possível no dia 1 realizar os tratamentos estatísticos com quatro replicatas, ao invés de três.

Após a obtenção dos resultados no dia 1, observou-se que no nível baixo ($2,122 \mu\text{g mL}^{-1}$) os valores de recuperação excederam 110% e o DPR (27,07%) estava acima do critério de aceitação de 7,33% para repetitividade, de acordo com a AOAC *International* (2012). Além disso, o valor deste ponto estava muito próximo do limite de detecção estimado, apresentado no item 4.4 (p. 50). Conseqüentemente, o primeiro ponto foi retirado da curva de calibração, passando a ter 9 pontos e iniciando pela segunda concentração: $6,381 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como consequência, o nível baixo para testes de precisão e exatidão foi alterado para tal concentração. No dia 2 foram preparadas uma curva de calibração e 9 amostras, sendo 3 em cada nível.

Para calcular o percentual de recuperação das amostras, os valores encontrados foram lançados na curva de calibração de modo que as concentrações de cada amostra fossem encontradas. Em seguida, foi calculada a recuperação em comparação com a curva de calibração. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 (p. 49).

Vale ressaltar que foi realizado o teste de “*Grubbs*” nos conjuntos de amostras para determinar a presença ou ausência de valores discrepantes. Para a avaliação deste teste, a hipótese nula (H_0) “Não há outliers” é aceita caso o valor p seja maior ou igual a 0,05 (nível de confiança de 95%). Obteve-se os seguintes valores p para os conjuntos de dados: 0,3039, 0,2234 e 0,3437. Logo, H_0 foi aceita, ou seja, não foram encontrados valores *outliers*.

De acordo com o AOAC *International* (2012), o critério de aceitação para exatidão nesta faixa de concentração corresponde a recuperações entre 80% e 110%. Através da Tabela 8 (p. 49),

pôde-se perceber que os valores de recuperação então de acordo com esse intervalo, sendo o parâmetro considerado satisfatório para o método em estudo.

De acordo com Anvisa (2017), a precisão deve ser demonstrada a partir da reprodutibilidade ou precisão intermediária e repetitividade. Para tratar os dados da precisão é necessário confirmar que os resíduos seguem distribuição normal e que são homocedásticos. Para tanto, utilizou-se os testes estatísticos de *Ryan-Joiner* e *Breush-Pagan*, respectivamente.

No primeiro deles, H_0 preconiza que os resíduos estão distribuídos normalmente e, por sua vez, H_a determina que os resíduos não estão distribuídos normalmente. Os valores p encontrados para cada nível, baixo, médio e alto, respectivamente, foram de 0,7634, 0,8464 e 0,4342, inferindo-se que, com 95% de confiança, há indícios que os resíduos estejam distribuídos normalmente. Já para o segundo teste, os valores p foram iguais a 0,9055, 0,7573 e 0,1018, demonstrando que os resíduos são homocedásticos, visto que, com 95% de confiança, há indícios para H_0 não ser rejeitada.

Após verificar a normalidade e a homocedasticidade dos resíduos, avaliou-se a repetitividade e a precisão intermediária encontrando-se os valores de DPR para cada nível de concentração estudado e comparando-os aos critérios de aceitação de repetitividade e precisão intermediária preconizados pelo AOAC *International* (2012) (Tabela 9; p. 50).

Tabela 8 – Porcentagem de recuperação das amostras considerando os dias 1 e 2

Dia 1				Dia 2			
Amostra	Nível	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de recuperação	Amostra	Nível	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de recuperação
1	Baixo	6,134	96,14	1	Baixo	6,444	101,00
2	Baixo	5,600	87,78	2	Baixo	6,684	104,77
3	Baixo	6,605	103,53	3	Baixo	5,943	93,16
4	Baixo	6,051	94,85				
5	Médio	18,971	100,00	4	Médio	19,751	104,12
6	Médio	19,085	100,61	5	Médio	19,229	101,36
7	Médio	20,348	107,26	6	Médio	17,862	94,16
8	Médio	20,680	109,01				
9	Alto	41,650	104,06	7	Alto	41,276	103,13
10	Alto	38,231	95,52	8	Alto	40,969	102,36
11	Alto	40,690	101,66	9	Alto	42,501	106,19
12	Alto	38,765	96,85				

Fonte: Autoria própria

Tabela 9 – Valores de DPR por nível de concentração

Nível de concentração	DPR Encontrado (Repetitividade)	DPR Máximo (Repetitividade)	DPR Encontrado (Precisão intermediária)	DPR Máximo (Precisão intermediária)
Baixo	7,27 %	7,33 %	7,27 %	11,00 %
Médio	4,88 %	7,33 %	5,14 %	11,00 %
Alto	3,36 %	7,33 %	4,17 %	11,00 %

Fonte: Autoria própria

A partir dos dados apresentados na Tabela 9, foi possível observar que os critérios determinados pela AOAC *International* (2012) foram atendidos. O DPR de repetitividade do nível baixo está bem próximo da especificação, porém já é esperado um DPR mais alto se comparado aos outros níveis de concentrações. Sendo assim, os parâmetros de precisão e exatidão foram considerados satisfatórios para o método em estudo.

O trabalho de Osnes *et al.* (1993) apresentado anteriormente, evidenciou recuperações de, aproximadamente, 97% através da adição de concentrações conhecidas de albumina e DPR de, no máximo, 2,4%. O presente trabalho apresentou recuperações entre, aproximadamente, 88% e 109% e DPRs para repetitividade de, no máximo, 7,27% que, comparando-se com o trabalho de Osnes *et al.* (1993), possui uma variação maior. Isso pode ser explicado pela diferença nas faixas de trabalho, visto que quanto menor a concentração da faixa de trabalho maior os critérios de aceitação, como demonstrado pela Tabela 2 (p. 22) e Tabela 3 (p. 23). O trabalho de Osnes *et al.* (1993) determinou a recuperação e DPR à 1700 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o presente trabalho apresenta concentrações de, aproximadamente, 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, justificando o aumento do critério de aceitação.

4.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi calculado utilizando-se o desvio padrão do intercepto obtido na análise de linearidade, por meio da Equação 2 (p. 24). Desta forma, primeiramente foi estimado em 1,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando-se o nível 1, porém pode-se perceber que tal valor está muito próximo do primeiro ponto da curva, sendo ele 2,122 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, como já foi apresentado no item 4.3 (p. 47), o desvio padrão relativo para este nível no teste de precisão não atendeu aos requisitos propostos sendo, portanto, retirado da curva de calibração. Consequentemente, o novo limite de detecção foi estimado em 2,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de maneira semelhante ao cálculo

anterior. Primeiramente retirou-se o primeiro ponto das curvas obtidas no teste de linearidade e, utilizando-se o novo desvio padrão do intercepto, calculou-se esse novo limite com base na Equação 2 (p. 24).

Através do trabalho apresentado por Martínez *et al.* (2020), que diferencia métodos para a determinação de proteínas, percebe-se um limite de detecção de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o método micro BCA. Porém, para diferentes amostras, o limite de detecção e quantificação podem apresentar grandes diferenças. Vale ressaltar que Martínez *et al.* não aponta a maneira como o limite de detecção foi calculado, podendo ser diferente se utilizar o desvio padrão do intercepto ou a medida de brancos.

O limite de quantificação foi calculado, primeiramente, tendo em vista o desvio padrão do intercepto obtido na análise de linearidade e com a utilização da Equação 3 (p. 24), porém o resultado não foi satisfatório, visto que estava acima do primeiro ponto da curva. De acordo com a RDC nº166 de 2017, os parâmetros de precisão e exatidão devem ser demonstrados na concentração do limite de quantificação. Tendo em vista que estes parâmetros foram testados para o novo primeiro ponto da curva ($6,381 \mu\text{g mL}^{-1}$) e que os resultados atenderam aos critérios propostos pela AOAC *International* (2012), como apresentado no item 4.3 (p. 47), o teor igual a $6,381 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi determinado como limite de quantificação do método em estudo (ANVISA, 2017).

Outro parâmetro para ser discutido é a faixa de trabalho apresentada pelo kit da Thermo Fisher Scientific do método micro BCA, sendo ele de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tendo em vista que a faixa de trabalho geralmente se inicia do limite de quantificação, pode-se suspeitar que o limite de quantificação encontrado pela Thermo Fisher Scientific seja de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo ele bem menor se comparado ao determinado no presente trabalho ($6,381 \mu\text{g mL}^{-1}$). Porém, esse limite pode variar dependendo das condições de cada laboratório, da maneira como foi calculado e da matriz que contém o analito. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2021, INMETRO, 2020).

Assim os limites de detecção e quantificação do método para determinação de proteínas totais em equipamentos da produção de soros hiperimunes da Fundação Ezequiel Dias foram estimados em, respectivamente, $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,38 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.5 Robustez

Na robustez, geralmente, variações pequenas são aplicadas para entender o comportamento do método. Porém, por meio da dição distinta de experimento.

Tabela 5 (p. 32) percebe-se uma grande variação entre os limites inferior e superior do tempo de incubação. Essa escolha pode ser justificada por RIBANI *et al.* (2014) que afirma que em caso de resultado satisfatório, a variável pode ser incorporada no método. Assim, pode-se perceber que o tempo de incubação determinado pelo fabricante do kit é muito extenso se comparado a outras referências (OLSON, MARKWELL, 2007, LU, FU, 2020). Logo, caso o resultado fosse satisfatório, o tempo de incubação passaria a ser menor, e, portanto, o método seria mais prático e rápido.

Os experimentos de robustez foram conduzidos da forma apresentada no Quadro 4 (p. 33) e, após análise de variância a partir do teste de Youden Steiner obteve-se os resultados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores da estatística F (F_{calc}) e do valor p relacionados ao teste de *Youden Steiner*

Variável	F_{calc}	valor p	Resultado
Tempo de incubação	17,504	<0,001	Significante
Temperatura de incubação	20,294	<0,001	Significante
Comprimento de onda	2,2151	0,058	Não significativa
Volume de WR	9,8776	<0,001	Significante
Volume da amostra	11,795	<0,001	Significante
Proporção do reagente MC no preparo do WR	15,765	<0,001	Significante
Tempo de agitação	2,8812	0,020	Significante

Sendo: $\alpha = 0,05$

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 10, infere-se que, com 95% de confiança, os fatores tempo de incubação, temperatura de incubação, volume de WR, volume de amostra, proporção do reagente MC para o preparo de WR e tempo de agitação devem ser controlados a fim de evitar distorções no resultado analítico do método. Além disso, não há indícios de que a variação nos comprimento de onda, de 542 e 582 nm, apresente impactos significativos ($\alpha = 0,05$) nos resultados do método.

Os fatores apresentados como significativos para o método podem deixar de sê-lo caso seja considerado uma diferença menor entre os níveis inferior e superior dessas variáveis. Porém, se essa redução for muito drástica, a diferença entre eles pode deixar de ser uma vantagem no método de quantificação.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e demonstrados no presente trabalho foram considerados satisfatórios para a finalidade pretendida visto que todos os parâmetros estudados estão de acordo com os critérios previamente estabelecidos. A linearidade mostrou que o modelo quadrático é mais adequado para representar o método em questão. Os parâmetros de precisão e exatidão estão de acordo com os limites preconizados pela *AOAC International*. A seletividade, apesar de ter efeito do interferente sulfato de amônio, foi considerada satisfatória considerando-se o objetivo do método proposto. Por sua vez, os limites de detecção e quantificação foram determinados como sendo, respectivamente, $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,38 \mu\text{g mL}^{-1}$. E a robustez mostrou que a variável comprimento de onda pode ser considerada robusta para o método em questão.

Após validar o método utilizado para verificação de limpeza da linha produtiva de soros hiperimunes, como perspectiva futura necessita-se realizar o teste de recuperação da proteína para completar a validação de limpeza. Assim, pretende-se realizar esta etapa através da utilização da metodologia de amostragem direta, com o auxílio de *swabs* para coleta do material de análise, contaminando-se placas de aço inox de 25 cm^2 com concentrações conhecidas de albumina para avaliar sua capacidade de recuperação. Portanto, para que a validação de limpeza esteja completa, deve-se realizar o teste de recuperação utilizando-se a metodologia validada neste trabalho para análise das amostras.

6. REFERÊNCIAS

- ACCONCI, C. **Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes**: filtração em membranas de afinidade. 1999. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. 1999. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/267527>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- ANDRADE, I. Validação de limpeza de equipamentos farmacêuticos. 2012. 124 f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal. 2012. Disponível em: https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/743/1/Mestrado%20GQSAalimentar_Ines_Andrade.pdf. Acesso em: 02 jun. 2021.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle da adesão e formação de filmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. v. 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 15 set. 2019.
- ANVISA. **Guias Relacionados à Garantia da Qualidade**. Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos – GGIMP. Brasília. 2006. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-07/guia-garantia-da-qualidade.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2021.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho 2017. Dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos e das outras providências. Diário Oficial da União, 11 de julho de 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 04 mai. 2021.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Aprova as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-Rábico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 nov. 1996. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1996/prt0174_11_11_1996.html. Acesso em: 04 mai. 2021.
- AOAC *INTERNATIONAL*. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. 2012. 17 p. Disponível em: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Acesso em: 26 mai. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS (DATASUS). Acidentes por Animais Peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informações de Agravos de Notificação - Sinan net. 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Acesso em: 11 mai. 2021.
- CARRERA, J. V. A. Validação do método analítico para a identificação do flavonide rutina num suplemento alimentar multivitamínico por HPLC. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal. 2021. Disponível em: https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/5640/1/TESIS%20JESSY%20IPL%20FINAL_2021%20%281%29.pdf. Acesso em: 02 jun. 2021.

DEEPACHANDI, B.; WEERASINGHE, S.; ANDRAHENNADI, T. P.; KARUNAWEERA, N. D.; WICKRAMARACHCHI, N.; SOYSA, P.; SIRIWARDANA, Y. Quantification of Soluble or Insoluble Fractions of Leishmania Parasite Proteins in Microvolume Applications: A Simplification to Standard Lowry Assay. **International Journal of Analytical Chemistry**, Hindawi, v. 2020, p. 1-8, 2020. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=41&SID=7Dzmq9lAyz1T7XzWAlx&page=1&doc=17&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

DOS ANJOS, D. P. **Estabelecimento do soro anticrotálico de referência nacional**. 2006. 38 f. Monografia (Especialização) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14180/1/6.pdf>. Acesso em: 07 mai. 2021.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. Second edition, 2014. Disponível em: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>. Acesso em: 15 jun. 2021.

FARIA, R. A. D.; SILVA, T. G. G. P.; SOARES, R. B.; RODRIGUES, C. G. Reutilização de terra diatomácea residual proveniente da produção de soros antiofídicos e antitóxicos. **Revista Matéria**. Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rmat/v23n4/1517-7076-rmat-23-4-e12215.pdf>. Acesso em: 06 mai. 2021.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria industrial. Divisão de Produção de Biológicos. **Operação, Limpeza e Sanitização dos Tanques Móveis**. Belo Horizonte: FUNED, 2019.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria industrial. Serviço de controle físico-químico. **Análises físico-químicas de plasma, soros hiperimunes para uso humano e seus intermediários**. 5. rev. Belo Horizonte: FUNED, 2020.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria industrial. Serviço de desenvolvimento de produtos biológicos. **Fórmula mestra de soro concentrado granel**, 2. ed. Belo Horizonte: FUNED, 2015.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Divisão da Garantia da Qualidade. Serviço de Validação e Qualificação. **Avaliação de produto em desenvolvimento – Soro Anti SARS-Conv-2 para validação de limpeza**. Belo Horizonte: FUNED, 2021 a.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Divisão da Garantia da Qualidade. Serviço de Controle Físico-Químico. **Validação do Método de Determinação de Proteína por Micro BCA para Validação de Limpeza da Produção de Soros Hiperimunes**. Protocolo: PVMA 004/19 DP. Belo Horizonte: FUNED, 2021 b.

INMETRO. **Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQCGCRE008. Coordenação Geral de Acreditação, Revisão 09. 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios. Acesso em: 15 jun. 2021.

LEE, J. W.; HALL, M. Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 13, p. 1259-1271, 2009. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode

=GeneralSearch&qid=3&SID=7Dzmq91Ayz1T7XzWAlx&page=2&doc=27&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

LEMOS, I. A. Avaliação de métodos espectrofotométricos para a determinação do teor de proteínas residuais nas preparações vacinais de Poliribosil Ribitol Fosfato (PRP). 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, RJ. 2019. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35573/2/izabel_azevedo_de_lemos.pdf. Acesso em: 18 mai. 2021.

LI, J. Z.; ZHAO, Y.; JIANG, X. L. Quantitative analysis of protein in thermosensitive hydroxypropyl chitin for biomedical applications. **Analytical Biochemistry**, v. 599, n. 113745, 2020. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=41&SID=7Dzmq91Ayz1T7XzWAlx&page=1&doc=9&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

LORENZEN, A.; KENNEDY, S. W. A Fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 1, p. 346-348, 1993. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=27&SID=7Dzmq91Ayz1T7XzWAlx&page=1&doc=14&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf). Acesso em: 10 jun. 2021.

LU, Y. S.; FU, T. J. Performance of Commercial Colorimetric Assays for Quantitation of Total Soluble Protein in Thermally Treated Milk Samples. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 6, p. 1337-1345, 2020. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=41&SID=7Dzmq91Ayz1T7XzWAlx&page=1&doc=14&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

LUCAS, E. P. R. **Estabelecimento do soro antibotrópico de referência nacional**. 2006. 30 f. Monografia (Especialização) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/33576/2/Monografia_especializa%c3%a7%c3%a3o_Elizabeth.pdf. Acesso em: 07 mai. 2021.

MARTÍNEZ, I.; HERRERA, A.; TAMES-ESPINSA, M.; BONDYALE-JUEZ, D. R.; ROMERO-KUTZNER, V.; PACKARD, T. T.; GÓMEZ, M. Protein in marine plankton: A comparison of spectrophotometric methods. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 526, n. 151357, 2020. Disponível em: https://apps-webofknowledge.ez107.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=41&SID=7Dzmq91Ayz1T7XzWAlx&page=1&doc=12&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em: 18 mai. 2021.

MINAS GERAIS. Funded. Secretaria Estadual de Saúde (Comp.). **Produção de soros heterólogos e hiperimunes da Funded**. 2018. Disponível em:

<http://www.funed.mg.gov.br/fazenda-experimental-sao-judas-tadeu/>. Acesso em: 11 mai. 2021.

MONACO, Luciana M. **Soros e vacinas do Butantan**. Instituto Butantan. São Paulo: 1º edição, 2018. Disponível em: https://repositorio.butantan.gov.br/bitstream/butantan/3394/1/soros_vacinas.pdf. Acesso em: 04 mai. 2021.

OLIVEIRA, A. T. A. L.; DE SOUSA, A. F. P. B.; ALCANTARA, I. C. L.; DE MIRANDA, I. T. N.; MARQUES, R. B. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil: revisão de literatura. **Revinter**. v. 11, n. 3, p. 119-136. Disponível em: <http://autores.revistarevinter.com.br/index.php?journal=toxicologia&page=article&op=view&path%5B%5D=389&path%5B%5D=572>. Acesso em: 04 mai. 2021.

OLIVEIRA, D. S. **Avaliação da Higienização em Indústria de processamento de carnes**. 2019. 53 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, GO. 2019. Disponível em: https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/631/1/disserta%c3%a7%c3%a3o_D%c3%a9borah%20de%20Souza%20Oliveira.pdf. Acesso em: 15 mai. 2021.

OLSON, B. J. S. C.; MARKWELL, J. Assays for determination of protein concentration. **Current protocols in protein science**, v. 48, n. 1, p. 3.4.1 - 3.4.29, 2007. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/0471140864.ps0304s48>. Acesso em: 10 jun. 2021.

OSNES, T.; SANDSTAD, O.; SKAR, V.; OSNES, M.; KIERULF, P. Total protein in common duct bile measured by acetonitrile precipitation and a micro bicinchoninic acid (BCA) method. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 53, n. 7, p. 757-763, 1993. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365519309092582>. Acesso em: 25 jun. 2021.

OUR WORLD IN DATA. Cumulative confirmed COVID-19 deaths. Covid-19 Data Explorer. 2021. Disponível em: https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer?zoomToSelection=true&time=2020-03-01..latest&pickerSort=desc&pickerMetric=total_cases&hideControls=true&Metric=Confirmed+deaths&Interval=Cumulative&Relative+to+Population=false&Align+outbreaks=false&country=~OWID_WRL. Acesso em 18 mai. 2021.

PECK, E. A.; VINING, G. G.; MONTGOMERY, D. **Introduction to Linear Regression Analysis**. 5. Ed. Nova Jersey: Wiley, 2012.

RAMOS, E. Itatiaia. **Soro contra a covid-19 desenvolvido pela Funed em Minas pode começar a ser testado em 2021**. 2020. Disponível em: <https://www.itatiaia.com.br/noticia/soro-contr-a-covid-19-desenvolvido-pela-funed-em-minas-pode-comecar-a-ser-testado-em-2021>. Acesso em: 17 mai. 2021.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>. Acesso em: 17 jun. 2021.

SANTOS, F. R. Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara,

SP. 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88341/santos_fr_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 10 jun. 2021.

SANTOS, F. R. Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88341/santos_fr_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 10 jun. 2021.

SANTOS, R. M. M. Contribuição da FUNED para a produção de soros antivenenos e antitóxicos no Brasil. **Revista Mineira de Saúde Pública**. Minas Gerais, n. 6, p. 13-19, 2005. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/coleciona-sus/2005/28146/28146-371.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2021.

SÃO PAULO. Instituto Butantan. Governo de São Paulo. **Soros e Vacinas**. 2017. Disponível em: <https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/soros>. Acesso em: 11 mai. 2019.

SILVA, T. A. Obtenção de SCQ e Validação de Metodologia Analítica para Doseamento de Solvente Residual Tolueno em Soros Hiperimunes. 2019. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Tecnológica) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2019.

SILVA, T. A. Obtenção de SCQ e Validação de Metodologia Analítica para Doseamento de Solvente Residual Tolueno em Soros Hiperimunes. 2019. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Tecnológica) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8. Ed. Trad. de Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2008.

SOBRINHO, A. P.; MEIRELLES, L. G.; DACASA, J. A. L.; CUNHA, L. E. R.; TAKEUTI, V. Y.; PARREIRAS, L. P.; MPALANTINOS, M. A.; CASTANHEIRA, P. N. Avaliação hematológica dos equinos produtores de soros hiperimunes antibotrópico da fazenda Vital Brazil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo, v. 11, n. 1, p. 61-62, 2011. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/5404/4667>. Acesso em: 04 mai. 2021.

SOUSA, D. F. Quantificação do pior caso contaminante em um estudo de validação de limpeza de equipamentos de uma fábrica de medicamentos. 2014. 46 f. Monografia (Curso de Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/556/7/DFS11072014.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2021.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S. Development and validation of an UV analytic method intended for quantification of captopril in delayed release tablets. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 35, n. 2, p. 212-223, 2006. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182006000200005. Acesso em: 18 mai. 2021.

SVOBODOVA, Z.; JANKOVICOVA, B.; PLICHTA, Z.; HORAK, D.; BILKOVA, Z. Evaluation of Colorimetric BCA-Based Quantification of Hydrazide Groups on Magnetic Particles. **Journal of Spectroscopy**. Hindawi, v. 2018, p. 1-5, 2018. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/jspec/2018/5492893.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2021.

SVOBODOVA, Z.; JANKOVICOVA, B.; PLICHTA, Z.; HORAK, D.; BILKOVA, Z. Evaluation of Colorimetric BCA-Based Quantification of Hydrazide Groups on Magnetic Particles. **Journal of Spectroscopy**. Hindawi, v. 2018, p. 1-5, 2018. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/jspec/2018/5492893.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2021.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. Micro BCA™ Protein Assay Kit. Shopp All Products. Catalog number: 23235. 2021. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23235#/23235>. Acesso em 28 jun. 2021.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Thermo scientific pierce protein assay technical handbook**. Version 2. 2010. Disponível em: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1602063_PAssayHB_122910.pdf. Acesso em: 12 jun. 2021.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. “*Protein Determination Procedures*” Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2021. NF 41, p. 2520-2521.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262476523_Determination_of_total_protein_by_spectrophotometry_Advantages_and_disadvantages_of_proposed_methods. Acesso em: 25 jun. 2021.