

**Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET MG**

**Vitória Pagotto Lassandro**

**Validação de Método Cromatográfico para a Quantificação da Matéria-  
prima Fenol Alternativo à Titulação Iodométrica de Kopperchaar**

**Belo Horizonte – MG**

**2023**

Vitória Pagotto Lassandro

**Validação de Método Cromatográfico para a Quantificação da Matéria-  
prima Fenol Alternativo à Titulação Iodométrica de Kopperchaar**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título  
Bacharel em Química Tecnológica pelo  
Centro Federal de Educação Tecnológica de  
Minas.

Patterson Patricio de Souza  
Orientador

Tiago Aparecido da Silva  
Coorientador

Belo Horizonte – MG  
2023

**Vitória Pagotto Lassandro**

**Validação de Método Cromatográfico para a Quantificação da Matéria-  
prima Fenol Alternativo à Titulação Iodométrica de Kopperchaar**

O presente trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Química Tecnológica do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas foi aprovado pela seguinte Banca Examinadora:

---

Doutor Patterson Patricio de Souza – CEFET  
Presidente da Banca Examinadora

---

Mestre Tiago Aparecido da Silva – Funed

---

Doutora Janice Cardoso Pereira Rocha – CEFET

---

Mestre Rangel Caio Quinino Dutra – Funed

Belo Horizonte, 16 de junho de 2023.

## DEDICATÓRIA

ओ श्री गुरुभ्यो नमः ॥

सदाशिवसमारम भां शङ्कराचार्यमध्यमाम् । अस्मदाचार्यपर्यन् वन्दे गुरुपरम्पराम् ॥  
श्रीजगन्मातरं देवी स्थिं तधीपद्मकासनाम् । हृदयसागरातीतां गोमतिं प्रणतोऽस्म्यहम् ॥

ओ

Aos mestres, que materializam a consciência de Śiva, as minhas eternas saudações e honrarias. Aos seus pés eu sempre me curvo. Às suas palavras eu sempre me atento. Às suas atitudes eu sempre me espelho.

Essa vida não me pertence.

Esse corpo não me pertence.

Nem meus pensamentos são de fato meus.

Essa personagem é apenas uma serva.

Este trabalho é de vocês.

Que a Tua luz faça luz nessa mente e no caminho a ser trilhado.

Om

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Gãneśa pela consciência, a vida, a escuta, o acolhimento, a remoção de todos os obstáculos, a inserção de todos os obstáculos, o privilégio de estudar e as bênçãos.

Aos meus pais, Eloah Maria Pagotto e Vicente Lassandro Neto, pelo cuidado e a dedicação na minha criação e da Maria e pelo apoio e o incentivo aos estudos. Pelo amor que sempre recebi.

À minha irmã Maria Pagotto Lassandro pelo carinho, abraços, gargalhadas e confidências.

Ao corpo docente do Departamento de Química do CEFET-MG por me ensinarem sobre a Química e a vida desde 2014. Pelo conhecimento, o carinho.

Ao Tiago Aparecido da Silva por me presentear com este trabalho. Por todo o conhecimento, a paciência, o cuidado, as conversas sérias, as conversas divertidas e marmita compartilhada em pleno sábado. Espero ter iniciado um bom legado de orientandos com o seu nome.

À Funed por ter possibilitado a realização deste trabalho. Por todo o aprendizado construído nesses quase 2 anos de estágio. Por me apresentarem uma nova versão da Vitória profissional.

Ao Guilherme Sena pelo acolhimento, a paciência ao ensinar e o auxílio do tratamento estatístico dos dados.

Às Fofquinhas responsáveis por 70% das análises do laboratório, vulgo Júlia Dias, Maria Luiza e Isabela Carvalho pelo convívio, risadas e apoio moral (psicológico e de bancada).

Ao Márcio Basílio, pela escuta, abraços, carinho, conversas, incentivos e cafés. Por ter me autorizado desistir para eu compreender que queria continuar.

Ao Patterson Patrício por ter aceitado me orientar neste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado em sala de aula.

Ao Richard pelo auxílio na compra do reagente necessário para a realização o trabalho.

Ao Rangel Dutra e Janice Cardoso por participarem da banca.

Aos analistas do laboratório do SCFQ pela paciência em todas as pesagens de fenol e discussões sobre os resultados.

Aos meus amigos pessoais pelo apoio moral e incentivo para a finalização do trabalho.

À minha coragem e fé em mim mesma, mesmo quando eu não me recordo que sou corajosa.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente influenciaram na concretização dessa trajetória.

“Os elementos químicos doam uma de suas partículas, o elétron, para outros elementos químicos, ficando com cargas positivas. Assim também são as pessoas: toda vez que doamos parte de nós a alguém, ficamos satisfeitos com a felicidade alheia. Isto caracteriza a mais pura e plena filantropia.” Autor desconhecido

## RESUMO

A Portaria n° 174/96 recomenda o uso do fenol como conservante antimicrobiano na formulação de soros hiperimunes para uso humano. O doseamento dessa matéria-prima é preconizado pelo método farmacopeico de titulação iodométrica de Kopperchaar. Essa metodologia apresenta algumas etapas sensíveis que podem ocasionar na determinação errônea do teor de fenol, como perda de bromo por volatilização, dificuldade em visualizar o ponto final e decomposição do indicador amido e do agente titulante. Outras desvantagens são o uso de reagentes tóxicos e tempo reacional elevado. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) se apresenta como uma técnica instrumental capaz de separar, identificar e quantificar substâncias inorgânicas, orgânicas e biológicas em diversas matrizes e apresenta vantagens como rapidez, automatização, recuperação de amostras e maiores sensibilidade e precisão em comparação ao método titulométrico. No presente trabalho, foram avaliadas as figuras de mérito conforme RDC n° 166/17 com o objetivo de validar um método instrumental para quantificação da matéria-prima fenol. Utilizou-se metanol: água 50:50 como fase móvel em fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma coluna C18 250x4,6 nm com 5 µm de tamanho de partícula e temperatura de forno a 35 °C. A faixa de trabalho foi de 5,0 a 9,0 mg L<sup>-1</sup>. O método proposto apresentou resultados de quantificação de fenol estatisticamente equivalentes aos métodos farmacopeico e espectrofotométrico, este já consolidado para o doseamento do fenol. Realizou-se uma avaliação do comportamento do método na presença de impurezas típicas do fenol que apresentam estruturas químicas similares. No método titulométrico foi observado um incremento do teor de fenol, devido, provavelmente a reações de bromação que ocorrem com as impurezas durante o método de Kopperchaar. Já na cromatografia líquida, foram obtidos teores de fenol estatisticamente equivalentes, garantindo a seletividade do método. Os dados obtidos foram ajustados de maneira satisfatória ao modelo de regressão linear simples. A recuperação do analito na análise de exatidão e precisão foi entre 99,67 a 100,07% com DPR máximo de 1,41%. Os limites de detecção e quantificação apresentaram valores de 1,18 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Futuramente será elaborado uma nota técnica à Anvisa sugerindo a implementação do método proposto como método farmacopeico alternativo à titulação iodométrica de Kopperchaar.

**Palavras-chave:** fenol, validação analítica, cromatografia líquida em fase reversa, método alternativo, método farmacopeico.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações envolvidas na produção do fenol. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch® .....	18
Figura 2 – Impurezas comumente encontradas no fenol. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch® .....	18
Figura 3 – Reação de bromação do fenol. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch® .....	19
Figura 4 – Reação entre 4-aminoantipirina e fenol. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch® .....	21
Figura 5 – Ciclo de vida do método analítico. Imagem gerada pelo programa Canva™. ....	22
Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo líquido .....	30
Figura 7 – Visão simplificada de uma coluna RP .....	31
Figura 8 – Exemplos de gráficos de resíduos .....	36
Figura 9 – Curva típica de uma distribuição normal .....	39
Figura 10 – Alterações da curva normal a depender dos valores de média e desvio padrão ...	39
Figura 11 – Fluxograma do teste de seletividade gerado no <i>software</i> LucidChart™ .....	48
Figura 12 - Fluxograma da análise titulométrica de comparação de método no <i>software</i> LucidChart™ .....	51
Figura 13 – Fluxograma da análise cromatográfica de comparação de método no <i>software</i> LucidChart™ .....	52
Figura 14 – Fluxograma dos testes de precisão e exatidão gerado no <i>software</i> LucidChart™	54
Figura 15 – Fluxograma para verificação dos LD e LQ gerado no <i>software</i> LucidChart™ ....	56
Figura 16 – Cromatograma do padrão de fenol .....	57
Figura 17 – Curvas de calibração utilizadas para avaliação da seletividade .....	58
Figura 18 – Estruturas químicas das impurezas $\alpha$ -metilestireno, catecol e m-cresol. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch® .....	61
Figura 19 – Mecanismo geral da reação de substituição eletrofílica aromática .....	63
Figura 20 – Cromatograma do catecol .....	64



Figura 21 – Cromatograma do m-cresol.....	65
Figura 22 – Cromatograma da amostra de fenol contaminado com impureza combinada .....	65
Figura 23 – Curva de calibração obtida para o teste de linearidade .....	71
Figura 24 – Resíduos da regressão linear da curva de calibração da linearidade.....	71
Figura 25 – Curvas de calibração utilizadas para a avaliação da precisão e da exatidão.....	73
Figura 26 – Curva de calibração utilizada para avaliação do limite de quantificação .....	76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros analíticos normalmente avaliados para os diferentes tipos de procedimentos de teste.....	23
Quadro 2 – Características do material de empacotamento das colunas cromatográficas .....	32
Quadro 3 – Principais detectores e suas aplicações.....	33
Quadro 4 – Escala de significância de Fisher.....	35
Quadro 5 – Interpretação dos resultados do teste de Durbin-Watson .....	41
Quadro 6 – Hipóteses e estatísticas do teste F.....	42
Quadro 7 – Hipóteses e estatísticas do teste T.....	43
Quadro 8 – Desvio padrão agrupado e graus de liberdade para comparação de médias de dois conjuntos de dados independentes para o teste T .....	44
Quadro 9 – Condições experimentais da análise cromatográfica.....	48
Quadro 10 – Descrição dos testes F e T (Student) realizados na Parte I da Seletividade .....	50
Quadro 11 – Parâmetros avaliados na análise estatística da linearidade.....	53
Quadro 12 – Resumo das condições de análise de precisão intermediária .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características físico-químicas do fenol .....	16
Tabela 2	– Preparo das soluções da curva de calibração do método cromatográfico.....	49
Tabela 3	– Preparo das soluções da curva de calibração do método espectrofotométrico ...	49
Tabela 4	– Resultados dos testes estatísticos para avaliação das curvas de calibração .....	58
Tabela 5	– Resultados de teores de fenol .....	59
Tabela 6	– Resultados de teores de fenol .....	60
Tabela 7	– Percentagem mássica de impureza em cada amostra .....	61
Tabela 8	– Teores de fenol (%) das amostras de titulação para comparação de método .....	62
Tabela 9	– Percentagem mássica de impureza nas amostras para cromatografia .....	64
Tabela 10	– Tempo de retenção do fenol .....	66
Tabela 11	– Teores de fenol para as amostras de padrão e padrão contaminado .....	66
Tabela 12	– Soma dos teores de fenol e percentuais de impureza adicionada em cada replicata de amostra analisada .....	67
Tabela 13	- Teores de fenol e pureza de pico para soluções contaminadas de 0,10% a 0,90%	68
Tabela 14	- Teores de fenol e pureza de pico para soluções de padrão de fenol puro .....	68
Tabela 15	- Teores de fenol e pureza de pico para soluções contaminadas a 1,00% .....	69
Tabela 16	– Curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade .....	70
Tabela 17	– Parâmetros avaliados no teste Anova para linearidade .....	72
Tabela 18	– Resultados dos experimentos 1 e 2 para avaliação da precisão e exatidão .....	74
Tabela 19	– Resultados dos testes estatísticos para avaliação da precisão e exatidão .....	74
Tabela 20	– Resultados de DPR e recuperação para avaliação de precisão e exatidão.....	75
Tabela 21	– Resultados dos limites de quantificação e detecção teóricos .....	76
Tabela 22	– Resultados das amostras de limite de quantificação.....	77

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1	Fenol .....	16
2.2	Titulação iodométrica de Kopperchaar para Quantificação do Fenol .....	19
2.2.1	Doseamento de fenol por outras técnicas.....	21
2.3	Validação analítica .....	22
2.3.1	Seletividade.....	23
2.3.2	Linearidade .....	24
2.3.3	Precisão .....	25
2.3.4	Exatidão .....	26
2.3.5	Limite de detecção .....	27
2.3.6	Limite de quantificação .....	28
2.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com Detecção por UV-VIS 29	
2.5	Análise estatística e parâmetros avaliados.....	34
2.5.1	Teste de hipóteses .....	34
2.5.2	Regressão linear simples.....	35
2.5.3	Análise de <i>outliers</i> .....	37
2.5.4	Normalidade.....	38
2.5.5	Aleatoriedade dos dados .....	40
2.5.6	Análise de Variância.....	42
2.5.7	Análise de médias .....	43
3	METODOLOGIA.....	45
3.1	Reagentes.....	45
3.2	Equipamentos .....	45

3.3	Validação Analítica .....	46
3.3.1	Análise estatística e critérios de aceitação .....	46
3.3.2	Seletividade.....	46
3.3.3	Linearidade .....	53
3.3.4	Precisão e Exatidão .....	53
3.3.5	Limites de Detecção e Quantificação .....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1	Seletividade – Parte I: Comparação de método.....	57
4.2	Seletividade – Parte II: Quantificação de fenol frente à impurezas .....	60
4.2.1	Análises realizadas no método titulométrico .....	61
4.2.2	Análises realizadas no método cromatográfico .....	63
4.3	Linearidade .....	69
4.4	Precisão e Exatidão.....	73
4.5	Limites de Detecção e Quantificação .....	75
4.6	Comparação de Método.....	78
4.7	Análise de Amostra Controle .....	79
5	CONCLUSÃO.....	80
5.1	Proposta de continuidade.....	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
	APÊNDICE A – PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL PELO MÉTODO DE KOPEERCHAAR .....	91
	APÊNDICE B – PREPARO DA SOLUÇÕES UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL PELO MÉTODO ESPECTROMÉTRICO .....	93
	ANEXO A - EXTRATO DO CERTIFICADO DE ANÁLISE DO PADRÃO DE FENOL EMITIDO PELA FUNED .....	94
	ANEXO B - EXTRATO DO CERTIFICADO DE ANÁLISE DA AMOSTRA CONTROLE EMITIDO PELA FUNED .....	95

# 1 INTRODUÇÃO

Na década de 1980, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos (PNCAAP). Um dos objetivos deste projeto era a obrigatoriedade de notificação dos acidentes com animais peçonhentos por intermédio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) <sup>[1]</sup>. Entre os anos de 2018 a 2022 foram notificados mais de um milhão de ocorrências com serpentes, escorpiões, aranhas, abelhas e animais contaminados com o vírus da raiva <sup>[2]</sup>.

A Fundação Nacional de Saúde (Funasa) recomenda a aplicação intravenosa de soros hiperimunes nos casos de acidentes por picadas e mordidas de animais peçonhentos como tratamento terapêutico <sup>[3]</sup>. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define soros hiperimunes como “preparações contendo imunoglobulinas purificadas, de origem animal, que neutralizam especificamente toxinas bacterianas, bactérias, vírus ou componentes tóxicos do veneno de uma ou mais espécies de animais peçonhentos” <sup>[4]</sup>.

Através dos dados coletados pelo SINAN foi possível melhorar o planejamento, a fabricação e distribuição de soros hiperimunes no Brasil tornando o país autossuficiente neste quesito. É de responsabilidade do Ministério da Saúde a aquisição dos soros e o fornecimento dos mesmos conforme o Programa Nacional de Imunizações (PNI) por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) <sup>[1,5]</sup>. Atualmente a produção nacional de soros é feita pelos seguintes órgãos: Instituto Butantan (São Paulo, SP), Instituto Vital Brazil (Niterói, RJ), Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológico (Piraquara, PR) e Fundação Ezequiel Dias (Funed) (Belo Horizonte, MG).

Dentre os soros disponibilizados pelo Ministério da Saúde, oito possuem sua produção autorizada nas dependências da Funed: soro antiofídico (pentavalente) (jararacas), soro antiofídico (pentavalente) e anticrotálico (jararacas ou cascavéis), soro antiofídico (pentavalente) e antilaquéutico (surucucus e jararacas), soro anticrotálico (cascavéis), soro antielapídico (bivalente) (corais verdadeiras), soro antiescorpiônico (escorpião), soro antirrábico (acidente com animal suspeito de raiva) e soro antitetânico (bacilo tetânico) <sup>[6]</sup>.

O soro, como produto final, apresenta-se na forma líquida em ampolas que devem ser mantidas em temperatura entre 4 a 8 °C para manutenção da sua estabilidade. Para controle da carga microbiana do medicamento, utiliza-se conservantes. A Portaria n° 174/96 recomenda o uso de fenol para este fim em concentração máxima permitida de até 0,35 g L<sup>-1</sup> oferecendo um tempo de prateleira do soro de até 3 anos <sup>[3,7]</sup>.

A metodologia de doseamento da matéria-prima fenol pela Farmacopeia Brasileira e órgãos internacionais é por meio da titulação iodométrica de Kopperchaar <sup>[7]</sup>. O método apresenta desvantagens como tempo reacional elevado, muitas etapas operacionais e uso de reagentes tóxicos <sup>[8]</sup>.

Dessa maneira, é coerente o estudo de novas metodologias para a quantificação de fenol a fim de atender às boas práticas de fabricação e controle de qualidade, garantindo um medicamento eficaz e seguro, com um método confiável e menos nocivo para os manipuladores. Pesquisas literárias mostram que algumas técnicas instrumentais já são estudadas para a quantificação de fenol <sup>[8,9]</sup>, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) devido suas vantagens de resolução, sensibilidade, precisão, especificidade e rapidez <sup>[10,11]</sup>.

Em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, a execução de metodologias que não estão presentes em compêndios oficiais deve ser precedida de uma validação analítica, conforme preconiza a RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. A validação possui como finalidade a avaliação de parâmetros analíticos, assegurando que o método forneça resultados confiáveis de acordo critérios pré-estabelecidos e dentro das condições laboratoriais <sup>[12]</sup>.

A validação é uma ferramenta da metrologia química que contribui com o desenvolvimento tecnológico, a fim de oferecer serviços, produtos e soluções inovadoras e mais eficientes para cidadãos e empresas. Uma das maneiras de fomentar essa área é o estabelecimento de redes internas ou externas aos laboratórios químicos e de pesquisa. As parcerias entre a Funed e as universidades já é uma prática consolidada na instituição e possibilita a realização de um trabalho cooperativo por meio da partilha de conhecimento, de pessoas e da estrutura (insumos, equipamentos, etc.). Sendo possível fortalecer o comprometimento com a inovação, complementando-se em recursos escassos entre os membros da rede e atendendo-se às necessidades de ambos <sup>[13]</sup>.

Neste contexto, o objetivo principal do trabalho é validar um método analítico utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por UV-VIS para quantificação da matéria-prima fenol como metodologia alternativa à farmacopeica que utiliza um método titulométrico clássico. O objetivo secundário é a elaboração de uma nota técnica à Anvisa sugerindo a implementação do método cromatográfico validado como método farmacopeico alternativo à titulação iodométrica de Kopperchaar. Além disso, busca-se estreitar a parceria entre a Funed e o Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), mediante a partilha de recursos humanos e materiais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FENOL

O fenol, também conhecido como ácido carbólico, hidroxibenzeno, monohidroxibenzeno, ácido fénico e monofenol, é um composto orgânico de fórmula molecular  $C_6H_6O$  configurado por um anel benzênico e um grupo hidroxila<sup>[14]</sup>. Os carbonos aromáticos possuem hibridização do tipo  $sp^2$  estruturalmente dispostos em geometria hexagonal planar em ângulos de  $120^\circ$ . Já a ligação do grupo funcional é caracterizada por uma conformação tetraédrica de  $109,5^\circ$ <sup>[15]</sup>.

A presença da hidroxila na estrutura do fenol possibilita a formação de ligações de hidrogênio contribuindo para a sua boa solubilidade em água (8,3 g/100 mL) e em outros solventes, como etanol e éter etílico, enquanto o anel aromático contribui para sua solubilidade em compostos apolares<sup>[15]</sup>. Em sua forma pura e em temperatura e pressão ambiente, o fenol é um sólido cristalino incolor a levemente rosado e possui odor característico doce e enjoativo, semelhante ao alcatrão<sup>[14,16]</sup>. As principais propriedades físico-químicas do fenol estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1– Características físico-químicas do fenol

Propriedade	Informação
Peso molecular	94,111 g mol <sup>-1</sup>
Coloração	Incolor a levemente rosado
Estado físico (20 °C)	Sólido líquido cristalino
Temperatura de fusão	40,91 °C
Temperatura de ebulição	181,75 °C
Densidade (20 °C)	1,0545 g cm <sup>3</sup>
Solubilidade em água (25 °C)	8,3 g/100 mL
Pressão de vapor (25 °C)	0,35

Fonte: Adaptado de AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (2008) e SAPUTERA *et al.* (2021)

Historicamente, na segunda metade do século XIX, o médico Joseph Lister destilou o alcatrão de hulha para obter uma solução rica em fenol que apresentava aspecto oleoso, coloração escura e odor forte. A mistura de compostos orgânicos foi testada e utilizada



pioneiramente como antisséptico e desinfetante em procedimentos pré e pós cirúrgicos para a lavagem de instrumentos e da pele de pacientes e profissionais da área [17,18].

A atividade do fenol como agente antimicrobiano ocorre por dois mecanismos possíveis: ruptura da estrutura celular ou impedimento da atividade enzimática do micro-organismo [19]. Independentemente da via, sua eficácia permitiu que Lister alcançasse excelentes resultados no processo de recuperação dos enfermos e na redução em casos de mortes por infecções pós-operatórias. Os procedimentos adotados por Lister revolucionou a medicina moderna e ele ficou conhecido como o “pai da cirurgia antisséptica” [17,18].

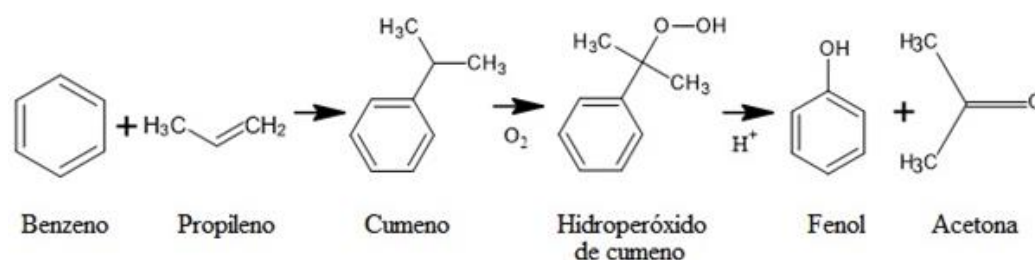
O uso do fenol para a manutenção da carga microbiana ainda é recorrente em produtos de limpeza doméstica e de higiene pessoal, como em desinfetantes e enxaguantes bucais [20]. Na área farmacêutica, exemplos de medicamentos com fenol são alguns antissépticos, analgésicos e antipiréticos [8], vacinas contra febre tifóide, varíola [21] e infecções pneumocócicas, produtos parenterais, injeções, além dos soros hiperimunes para uso humano. Normalmente a concentração deste conservante nas formulações finais é de até 0,5% em pH abaixo de 9,0 [22]. O fenol é utilizado também em outros segmentos industriais para produção de pesticida, verniz, celulose e borracha [14,23].

Apesar da inovação promovida por Lister, durante os procedimentos cirúrgicos, seus colegas de trabalho experienciaram os efeitos tóxicos do fenol [18]. Este conservante é facilmente absorvido por inalação, ingestão e contato cutâneo, podendo causar fadiga, mal-estar, náuseas, vômitos, dor de cabeça, salivação, irritação e queimadura da pele e das vias respiratória e gastrointestinal [24]. Já os efeitos crônicos por exposição ao fenol incluem perda de peso, vertigem, distúrbios alimentares e escurecimento das fezes e urina [14,15,25].

Neste contexto, a quantificação do fenol nos produtos finais se torna de extrema importância para impedir os efeitos toxicológicos quando em contato com seres vivos, principalmente em medicamentos. Além disso, o controle de qualidade do fenol como matéria-prima é primordial para garantir sua eficácia como agente conservante, avaliando-se parâmetros físico-químicos como identificação e doseamento [26].

Industrialmente, 70% do fenol comercializado no mundo é produzido através do *Hack Process*, dividido em três etapas principais. A Figura 1 resume as reações envolvidas no seu processo produtivo.

Figura 1 – Reações envolvidas na produção do fenol. Estruturas feitas no *software* ChemSketch®.

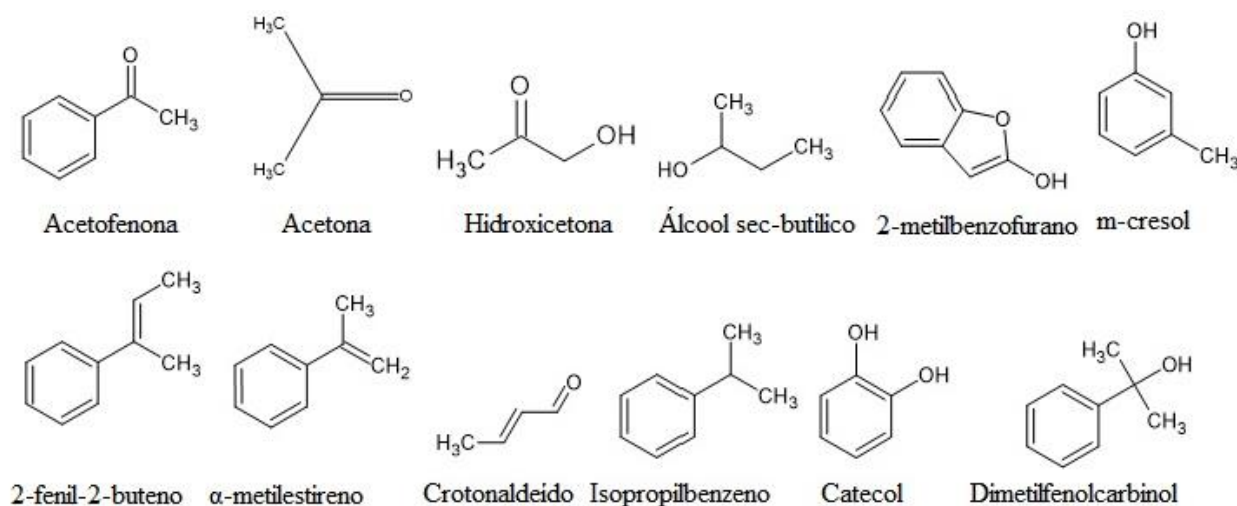


Fonte: Adaptado de FORTUIN *et al.* (1953)

Na primeira etapa, ocorre uma reação radicalar de alquilação do benzeno com propileno, na presença de um catalisador ácido, para a formação do cumeno [27,28]. O cumeno é, então, oxidado a hidroperóxido de cumeno que sofre degradação em meio ácido gerando o fenol e a acetona. Após sua produção, a purificação do fenol ocorre por destilação [27–29].

O fenol pode conter impurezas provenientes do seu processo produtivo, como as próprias matérias-primas e produtos secundários do processo, tais quais o cumeno e a acetona. Além destas, é possível encontrar outras substâncias classificadas como impurezas. A Figura 2 sintetiza alguns desses possíveis contaminantes [30–34].

Figura 2– Impurezas comumente encontradas no fenol. Estruturas feitas no *software* ChemSketch®.



Fonte: Adaptado de BAYNAZAROV *et al.* (2018), BRUK *et al.* (1969), American Society for Testing Materials (2005), American Society for Testing Materials (1999) e Agência Europeia das Substâncias Químicas (2006)

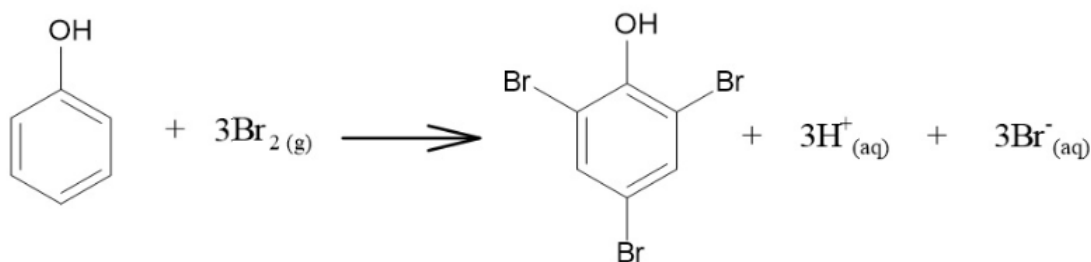
Algumas das substâncias apresentadas na Figura 2 são originadas em reações cruzadas condensação, desidratação, oxidação e dimerização durante a produção do fenol [34].

## 2.2 TITULAÇÃO IODOMÉTRICA DE KOPPERCHAAR PARA QUANTIFICAÇÃO DO FENOL

O procedimento de Kopperchaar, desenvolvido em 1876, consiste na determinação indireta de fenol em uma titulação de oxirredução por iodometria. A Anvisa, por meio da Farmacopeia Brasileira, recomenda essa metodologia para o doseamento da matéria-prima fenol [8,35].

A primeira etapa do método de Kopperchaar é a bromação do fenol em meio ácido na reação de substituição eletrofílica aromática (Figura 3), formando o 2,4,6-tribromofenol, pouco solúvel em água [36,37]. Este composto, assim como outros bromofenóis, fotodegradam por desbromação reductiva com perdas sucessivas de átomos de bromo [38]. No procedimento de Kopperchaar, a bromação ocorre durante o período de 30 minutos ao abrigo de luz.

Figura 3 – Reação de bromação do fenol. Estruturas feitas no *software* ChemSketch®.

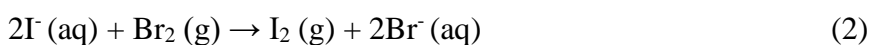


Fonte: Adaptado de DREIJER VAN DER GLAS *et al.* (1983)

O bromo molecular que reage com o fenol anteriormente é formado pela reação de bromato e brometo em meio ácido, como mostra a Equação 1.



Após a formação do 2,4,6-tribromofenol, adiciona-se excesso de iodeto de potássio ao sistema. Em contato com o excesso de bromo molecular, o iodeto sofre oxidação, variando seu número de oxidação (NOx) de -1 para 0 (Equação 2). Já o bromo é reduzido de NOx 0 para -1. Nesse momento é observado a mudança da coloração da solução se tornando vermelho-tijolo intenso.



A perda do iodo molecular por volatilização é evitada pelo excesso de íon iodeto estabelecendo um equilíbrio químico entre as partes (Equação 3, página 20) e pela titulação ágil

após adição do iodeto de potássio. Normalmente, soluções com até 4% de iodeto apresentam volatilização que não interfere nos resultados [39,40].



A terceira etapa do método de Kopperchaar é a titulação iodométrica indireta que se baseia na reação de redução do excesso de iodo molecular em iodeto pelo agente titulante [41], que neste contexto é o tiosulfato de sódio. O íon tiosulfato é quantitativamente oxidado pelo iodo formando tetrionato, como mostra a Equação 4.



Em meio alcalino, o iodo é hidrolisado formando o íon hipiodito ( $\text{IO}^-$ ). Este íon pode oxidar o íon tiosulfato à sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ). Apesar de ainda ocorrer a oxirredução entre iodo e tiosulfato, há a alteração estequiométrica da reação, podendo levar a resultados errôneos. Essa situação é solucionada pelo controle de pH da solução a ser titulada. Deve-se manter pH menor que 7,6 em concentrações de iodo a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  [39].

Outro ponto importante e possível fonte de erro na iodometria é a rápida decomposição do íon tiosulfato em meio fortemente ácido. Como a reação de oxidação do tiosulfato pelo iodo molecular é mais rápida que a sua decomposição, a adição lenta do titulante em agitação constante e vigorosa evita o excesso local do reagente, tornando possível a titulação iodométrica em meio ácido [39].

O ponto final da titulação pode ser observado pela alteração da coloração amarela a incolor do iodo em solução aquosa de iodeto de potássio. Porém, para melhor visualização é recomendado o uso de intensificadores de cor, como a suspensão de amido solúvel [39,41,42].

Um dos polímeros que constituem o amido é a  $\beta$ -amilose. Sua cadeia helicoidal adsorve pequenas quantidades de íon triiodeto ( $\text{I}_3^-$ ) desenvolvendo uma coloração azul intensa. Após a redução completa do iodo molecular, o íon triiodeto, que participa do seu equilíbrio químico (Equação 3), também não se torna mais disponível na solução para o amido. Dessa maneira, a coloração azul escuro anteriormente observada se torna incolor, indicando o ponto final da titulação [37,41,42].

A alteração da cor da solução pelo amido pode ser prejudicada se o mesmo for adicionado no início da titulação. Devido a decomposição irreversível desta substância intensificadora da cor na presença de iodo em elevada concentração, sua adição deve ser feita apenas próximo ao ponto final quando a solução apresenta coloração levemente amarelada [40,42]. A adição de

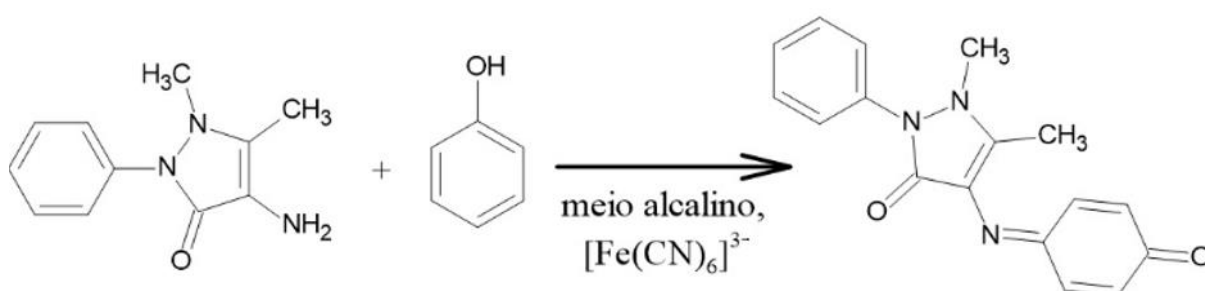
solventes orgânicos, como o clorofórmio, diminui a afinidade do amido com o iodo, sendo utilizado como recurso para impedir sua decomposição <sup>[41]</sup>.

A reação de Kopperchaar é eficaz e recomendada por órgãos internacionais, como as farmacopeias europeia, britânica, estadunidense e japonesa. Apesar de amplamente divulgada e empregada, a metodologia consiste em muitas etapas, o tempo reacional da bromação é elevado - aproximadamente trinta minutos - e emprega-se uma variedade considerável de reagentes tóxicos <sup>[8]</sup>.

### 2.2.1 Doseamento de fenol por outras técnicas

Outra metodologia para o doseamento de fenol é por espectroscopia na região do ultravioleta e no visível (UV-VIS), como sugere a Portaria n° 174/96 <sup>[7]</sup>. Nesse método, o fenol reage com 4-aminoantipirina, na presença de um agente oxidante, como o ferricianeto de potássio, em meio alcalino (pH entre 9,4 a 10,2), formando antipirina numa proporção de 1:1 (Figura 4). O produto da reação possui coloração vermelha e pode ser quantificável por espectrofotometria na região do visível (546 nm) após 10 min da mistura dos reagentes <sup>[43]</sup>. Entre os principais fatores que podem influenciar os resultados obtidos pela espectrofotometria estão o controle de pH <sup>[44]</sup>, o tempo reacional e a fotossensibilidade da antipirina.

Figura 4 – Reação entre 4-aminoantipirina e fenol. Estruturas feitas no software ChemSketch ®



Fonte: Adaptado de MOSAE SELVAKUMAR (2018)

Na literatura são encontradas outras metodologias para a quantificação de fenol em matrizes ambientais e farmacológicas envolvendo a aplicação de técnicas instrumentais, como a espectrofotometria <sup>[8,45]</sup>, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, eletroforese capilar e cromatografia gasosa por espectrometria de massas e ionização por chama <sup>[10]</sup>.

O HPLC é outra técnica amplamente estudada para a quantificação de princípios ativos em fármacos, coadjuvantes e suas impurezas [46,47]. Já foi investigado o doseamento do fenol por meio do HPLC em matrizes industriais [11,48], alimentícias e urinárias [49,50], além de sua avaliação como impureza em produtos farmacêuticos [9,51].

### 2.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação é uma análise sistemática, formal e documentada a fim de comprovar a capacidade do método em fornecer resultados confiáveis e reprodutíveis para o seu uso pretendido. A Figura 5 está representando o ciclo de vida de um método analítico, no qual a validação está inserida [52].

Figura 5 – Ciclo de vida do método analítico. Imagem gerada pelo programa Canva™.



Fonte: Adaptado de RILEY, CLARKE e KIKOVSKA-STOJANOVSKA (2020)

O processo de validação analítico consiste na observação do comportamento do método em condições pré-determinadas e na comparação das nuances verificadas com as expectativas de desempenho. A concordância entre a performance e os resultados prospectivos indicam a validade ou não do método [53]. Os principais parâmetros de desempenho analítico são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez. A escolha destes é definida a depender das exigências do órgão regulamentador, da finalidade do método, do senso técnico e das características da amostra [52].

No setor farmacêutico, a Anvisa preconizou a RDC n° 166/2017, responsável por estabelecer os critérios de validação de métodos utilizados para insumos farmacêuticos, produtos biológicos e medicamentos [12]. Os parâmetros necessários para a validação da metodologia, a depender da sua aplicabilidade, estão indicados no Quadro 1 (pág. 23).

Quadro 1 – Parâmetros analíticos normalmente avaliados para os diferentes tipos de procedimentos de teste

Parâmetro analítico	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento *
		Quantitativo	Ensaio limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão (repetibilidade)	Não	Sim	Não	Sim
Precisão intermediária	Não	Sim <sup>(1)</sup>	Não	Sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não <sup>(3)</sup>	Não	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não <sup>(3)</sup>
Linearidade	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: Adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2017)

A RDC n° 166/2017 foi fundamentada a partir de referências de compêndios internacionais, a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*), a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*).<sup>[54]</sup>

### 2.3.1 Seletividade

A RDC n° 166/2017 define como seletividade de um método a “capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz”<sup>[12]</sup>.

A avaliação da seletividade no desenvolvimento e validação de um método analítico é justificada pela existência de outros compostos na amostra que podem interagir com o analito de interesse. É possível que essa interação resulte no impedimento da detecção do sinal do analito, assim como no incremento ou diminuição do sinal, obtendo-se um valor que não é confiável<sup>[52,53]</sup>. Além das interações entre as substâncias da amostra, é possível que ocorra uma alteração da sensibilidade do detector pela presença das mesmas<sup>[53]</sup>.

Os ensaios utilizados na avaliação da seletividade compreendem a análise de materiais de referência, amostras com e sem analito - quando possível - e ambos com a adição apropriada de compostos interferentes conhecidos ou suspeitos<sup>[53,55]</sup>.

Nos métodos cromatográficos, pode se comparar os cromatogramas obtidos dos padrões, da amostra enriquecida, da amostra não enriquecida e dos respectivos brancos de interferentes (solventes, impurezas, etc.). Cada composto deve ter um tempo de retenção identificável e tempo de retenção do analito de interesse nas amostras deve ser o mesmo daquele obtido do material de referência [52,56,57]. Deve-se avaliar também se há diminuição ou aumento do pico devido à presença dos interferentes. Em caso positivo, é necessário alterar as condições experimentais para melhorar a seletividade do sinal analítico [55,56].

Em condições nas quais não é possível obter padrões de referência ou os possíveis interferentes da amostra, a análise da seletividade deve incluir a comparação com outro(s) método(s) previamente validado(s) [53,55-57] ou modificação das condições instrumentais [55]. Em análises cromatográficas por detecção de arranjo de diodos, métodos indiretos também podem ser utilizados para avaliar a seletividade, como a pureza dos picos [52,57].

### 2.3.2 Linearidade

A linearidade é um parâmetro de validação que analisa a qualidade do método analítico em fornecer sinais do detector que são diretamente proporcionais à(s) concentração(s) do(s) analito(s) em uma faixa de trabalho. A resposta linear pode ser obtida diretamente ou através de uma transformação matemática [9,52,58-60].

Há algumas variações nas diretrizes metodológicas para os ensaios da linearidade, porém, de maneira geral, é recomendado que sejam analisadas, no mínimo, três curvas e que as mesmas sejam independentes, sempre que possível, ou seja, as replicatas não devem ser repetições de leitura da mesma solução. Além disso, a curva deve conter de 5 a 6 níveis de concentrações distintas, equidistantes e analisadas aleatoriamente. Quando há efeito de matriz, as soluções são preparadas com a adição de matriz [52,53,55].

A faixa de trabalho é escolhida de acordo com o objetivo do método. Para metodologias de doseamento é recomendado a faixa entre 80 a 120% em relação ao ponto central da curva, sendo possível encontrar pequenas variações desse valor [52,56,59,60]. A amostra analisada rotineiramente deve se aproximar do centro da curva, uma vez que há menores incertezas nos pontos centrais da curva [53].

Conforme preconizado pela RDC nº 166/2017, a avaliação da linearidade abrange:

- 1) gráfico dos sinais analíticos (ou suas transformações matemáticas) em função da concentração do analito de interesse;



2) gráfico da dispersão dos resíduos com estudo estatístico: é esperado que os resíduos se distribuam de maneira aleatória, conferindo a homocedasticidade dos dados. Nos casos de heterocedasticidade, observa-se que os resíduos se comportam de maneira tendenciosa [52,55]. Testes estatísticos como Cochran, Brown-Forsythe e Breusch Pagan também são utilizados para avaliar a homocedasticidade dos dados [52];

3) a equação da reta de regressão linear simples por meio do método dos mínimos quadrados [12,55];

4) avaliação da linearidade pelos coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $r^2$ ): em níveis de elevada ou baixa concentração, é possível observar desvios da linearidade mesmo com bons valores de coeficientes, dessa maneira, os mesmos são utilizados apenas como indicativos à adequação da reta ao modelo linear [52,55]. A RDC n° 166/2017 indica que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 e o de determinação maior ou igual a 0,980 [12];

5) avaliação do coeficiente angular: seu valor deve ser consideravelmente diferente de zero, indicando a sensibilidade do método [12].

### 2.3.3 Precisão

A precisão de um método analítico refere-se ao grau de dispersão de uma série de resultados obtidos por meio de ensaios com amostras independentes e condições definidas pelo método a ser validado, não se relacionando ao valor verdadeiro ou especificado. Há três níveis de avaliação da precisão: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade [53,61,62].

A repetibilidade avalia a precisão sob as mesmas condições operacionais (operadores, equipamentos, local, reagentes, etc.) num curto intervalo de tempo, sendo necessário a reexecução de todo o método com análise de padrões, materiais de referência ou adição do analito ao branco da amostra [52,55,61].

Os compêndios oficiais indicam a realização de 6 a 15 repetições independentes por analito englobando toda a faixa de trabalho [53,55]. A RDC n° 166/2017 exige a análise de 6 replicatas a uma concentração de 100% ou 9 replicatas em três concentrações diferentes, ou seja, 3 replicatas para cada nível de concentração (baixa, média e alta) [12].

Os resultados da repetibilidades são expressos através do desvio padrão relativo (DPR) (também chamado de coeficiente de variação) por nível de concentração avaliado, sendo este um fator sugerido para estabelecer o critério de aceitação do método. Para concentrações de

analito a 0,001 e 0,0001%, a Associação de Químicos Analíticos Oficiais sugere um DPR máximo de 7,3 a 11,0 %, respectivamente <sup>[55]</sup>.

Em uma rotina laboratorial, o cenário de análise é variável: alteração de fornecedores e lotes de reagentes, profissionais atuando em turnos, temperatura, etc. Deste modo, torna-se necessário verificar se o método analítico é capaz de fornecer resultados confiáveis mesmo em condições operacionais distintas. Este é o principal objetivo da precisão intermediária, ou precisão intralaboratorial, que expressa a variação dos resultados obtidos a partir de um método e uma mesma amostra (amostras supostamente idênticas ou padrão) analisada em diferentes circunstâncias no mesmo laboratório <sup>[52,55]</sup>.

A precisão intermediária é realizada seguindo as mesmas recomendações em termos de número de replicatas e concentrações apresentadas para a repetibilidade, porém variando algumas condições <sup>[12,52]</sup>. Estas devem ser pré-definidas, sendo as mais comuns o dia de análise, o operador e o equipamento utilizado <sup>[52,53,58]</sup>.

Já a reprodutibilidade avalia a precisão interlaboratorial, na qual as amostras idênticas (ou homogêneas ou padrões) são analisadas em diferentes laboratórios <sup>[52]</sup>. Normalmente aplica-se este tipo de avaliação em metodologias que serão publicadas nos compêndios oficiais, em transferência de tecnologia e em estudos colaborativos <sup>[58,61]</sup>

#### **2.3.4 Exatidão**

A exatidão é o parâmetro que avalia o nível de conformidade entre os resultados individuais obtidos pelo método a ser validado e o valor admitido como verdadeiro <sup>[12,53,62]</sup>. Diferentemente da precisão que está relacionada com os erros aleatórios, a avaliação da exatidão reflete o efeito dos erros sistemáticos do método <sup>[54,61]</sup>.

Assim como na precisão, a exatidão é avaliada com três replicatas independentes em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) <sup>[12,62]</sup>. A escolha do procedimento vai depender da viabilidade laboratorial, da amostra e da técnica analítica utilizada. A princípio recomenda-se a comparação do resultado de um material de referência certificado analisado pelo método em estudo e o seu valor de referência, desde que este material se assemelhe em termos de matriz e concentração à amostra que posteriormente será analisada. Em analitos com matriz complexa, adiciona-se uma quantidade conhecida de material de referência à amostra <sup>[52-54]</sup>. Nos casos de indisponibilidade de materiais certificados, compara-se os resultados do método em validação com aqueles de um método já validado <sup>[53,54]</sup>.

A exatidão deve ser expressa em termos de recuperação, conforme as Equações 5 e 6 <sup>[12]</sup>:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração conhecida}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{CA(amostra adicionada)} - \text{CA (amostra)}}{\text{CTA}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

CA: concentração experimental do analito;

CTA: concentração teórica do analito adicionado.

Como as validações analíticas possui uma elevada variabilidade em termos de método utilizado, matriz da amostra, concentração da solução de trabalho, etc., os critérios de aceitação são definidos a partir destas especificidades <sup>[12,52]</sup>. Para analitos em concentrações entre 1 a 10 mg L<sup>-1</sup> é previsto uma recuperação entre 80 a 110% <sup>[52,53,55]</sup>. Quando a exatidão é realizada por comparação de método, utiliza-se testes estatísticos, como Teste T para dados homocedásticos e normalizados, a fim de fundamentar os dados verificando a equivalência dos mesmos <sup>[54][53,54,61]</sup>. Outro critério de aceitação possível é delimitar uma diferença máxima entre as recuperações. Para métodos de doseamento em cromatografia líquida é comum aplicar o valor de 2% como critério <sup>[52]</sup>.

### 2.3.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) define a menor quantidade de analito que pode ser identificada e observada no método sob condições de análise, sem, necessariamente, ser quantificada <sup>[54,55]</sup>. O LD também pode ser definido como a menor concentração do analito no qual é possível distinguir do ruído <sup>[52]</sup>. Outros termos utilizados como sinônimo para LD são concentração mínima detectável <sup>[54]</sup> e valor mínimo detectável <sup>[52]</sup>.

Apesar deste parâmetro ser crucial apenas em métodos para limite de impurezas e elementos traços, é comum encontrar, na literatura, a análise de LD em validações de doseamento de insumos ativos e produtos farmacêuticos. Nestas situações, o LD será apenas informativo e não necessário para a validação analítica <sup>[52]</sup>

Há vários procedimentos possíveis para a determinação do LD<sup>[53]</sup>, sendo três as principais e atualmente decretados pela Anvisa: método visual, razão sinal-ruído e através de parâmetros da curva analítica <sup>[12,52,54]</sup>.

O método visual foi desenvolvido, a priori, para ensaios de caráter qualitativo. A partir da análise do analito em diluições sucessivas é possível identificar em qual concentração o sinal analítico é confiavelmente diferenciável do ruído. Em métodos cromatográficos, os compêndios oficiais recomendam a apresentação dos cromatogramas mais relevantes <sup>[52-54]</sup>.

A determinação do LD baseado no sinal-ruído só pode ser empregada em métodos que possuem ruídos em linha de base. Experimentalmente são analisadas amostras em baixas concentrações de analito até que o sinal observado seja 2 ou 3 vezes o desvio padrão da amostra do branco <sup>[52-54]</sup>.

Na terceira abordagem, o LD é calculado por meio do quociente do desvio padrão e a da inclinação da curva de calibração, como mostra a Equação 5 <sup>[12]</sup>.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (5)$$

Onde:

LD: limite de detecção;

$\sigma$ : desvio padrão;

IC: inclinação da curva de calibração.

O desvio padrão pode ser obtido por três maneiras distintas: 1) o intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração que possuem concentrações do analito próximas ao possível valor de LD; 2) o desvio padrão residual da linha de regressão; 3) estimativa do ruído de uma quantidade suficiente de amostras do branco <sup>[12]</sup>. Quando não há sinal obtido pela análise do branco, emprega-se o desvio padrão da menor concentração da curva analítica <sup>[55]</sup>.

O LD normalmente é expresso em termos de concentração do analito e o seu valor não significa a impossibilidade de sinal analítico em concentrações menores. Porém, o LD garante que naquela concentração o analito seja detectado com confiabilidade estatística razoável. Em concentrações muito inferiores pode ocorrer da incerteza da medição ser maior que o próprio valor medido <sup>[53]</sup>.

### 2.3.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) ou limite de determinação é definido como a menor quantidade de analito que pode ser mensurado sob as condições experimentais com precisão e

exatidão adequadas. Seu valor é expresso em termos de concentração do analito ou conforme é expresso no método analítico [52].

Em análises cromatográficas pode-se considerar a concentração do analito que corresponde a uma altura de 10 a 20 vezes o ruído da linha de base [53]. Algumas referências aplicam a relação de 6:1 ou 5:1 do sinal/ruído [55]. Em outros cenários, o nível mais baixo da curva analítica é assumido como o LQ. Outra maneira de calcular o LQ é por meio do quociente entre o desvio padrão e a inclinação da curva de calibração, como indica a Equação 6, de maneira similar ao qual é feito para o LD [12,52].

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (6)$$

Onde:

LQ: limite de quantificação;

$\sigma$ : desvio padrão;

IC: inclinação da curva de calibração.

O desvio padrão da Equação 6 é obtido da mesma maneira descrita para o LD da Equação 5 [12].

Após a determinação do LQ, é recomendado sua confirmação experimental através da precisão e recuperação de no mínimo 6 amostras independentes. Caso não estejam dentro dos critérios de aceitação, averigua-se que o LQ está subestimado e é necessário estimar novamente o seu valor [55].

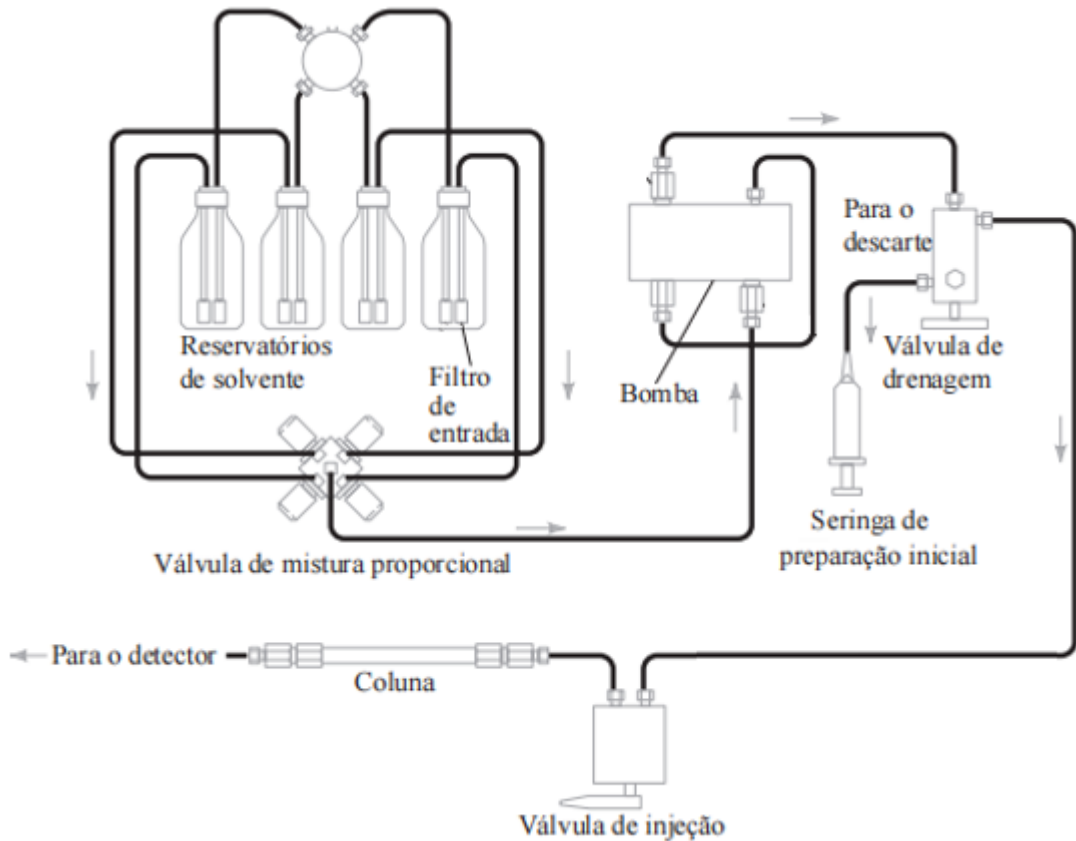
## **2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA COM DETECÇÃO POR UV-VIS**

Através de um gás ou solvente líquido denominados fases móveis, uma solução contendo o(s) analito(s) de interesse é carregada ao longo de um meio poroso, a fase estacionária. Em contato com a superfície desse meio, os diferentes analitos interagem de maneiras distintas com a fase estacionária, ocasionando em detecção com períodos de tempo diferentes. Esse mecanismo é a base das análises cromatográficas [63]. Essas são aplicadas para a separação, a identificação e o doseamento de substâncias orgânicas, inorgânicas e biológicas [42].

Entre os diversos tipos de cromatografia, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca pela precisão, automatização, recuperação das amostras, sensibilidade e

diversidade de matrizes de amostra <sup>[47]</sup>. A Figura 6 apresenta um esquema simplificado de um cromatógrafo líquido <sup>[42]</sup>.

Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo líquido



Fonte: Adaptado de SKOOG *et al.* (2006)

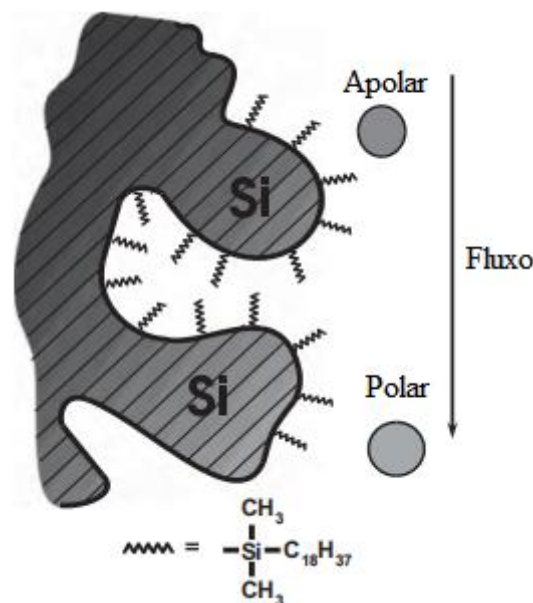
Os solventes que compõem a fase móvel são previamente misturados e direcionados pela bomba até a coluna. Na válvula de injeção, a amostra solubilizada, homogênea e livre de partículas sólidas é injetada através de uma seringa. Ao entrar em contato com a fase móvel, a solução é carregada até a coluna que interage com os sítios ativos da mesma. As substâncias que apresentam menor afinidade com a fase estacionária são primeiramente carregadas pela fase móvel em direção ao detector. Neste momento há geração e identificação dos sinais eletrônicos referentes ao analito(s). À medida que a corrida acontece, a fase móvel e as demais substâncias presentes na amostra que apresentam maior afinidade com a coluna e as mesmas são sucessivamente detectadas <sup>[42]</sup>.

A cromatografia líquida em fase reversa (RP, do inglês *reversed-phase*) é aplicada na maioria das análises com amostras de baixa massa molecular. Nessa técnica emprega-se uma coluna hidrofóbica com fase móvel polar, de modo que a principal interação analito-fase

estacionária se dá por forças dispersivas de Van der Waals. Devido à baixa energia desse tipo de interação, a RP apresenta ótima seletividade para discriminar compostos quimicamente parecidos [63].

A Figura 7 mostra uma visão simplificada e ampliada de uma coluna de suporte de sílica com grupos octadecil (C18) tipicamente utilizada em análises de CLAE por RP. Pelo tipo de superfície da coluna, as substâncias mais apolares interagem mais fortemente com os grupos C18 hidrofóbicos enquanto os componentes mais polares eluem com mais velocidade [47].

Figura 7 – Visão simplificada de uma coluna RP



Fonte: Adaptado de DONG (2006)

As colunas cromatográficas de RP são constituídas por uma base, normalmente, de sílica, zircônia, alumina ou polímeros e possuem a superfície modificada a fim de garantir determinadas características para a coluna. Para análises em fase reversa, utiliza-se octadecil (C18), octil (C8), ciano (CN) e fenil para modificação da base, sendo que colunas do tipo C18 são a primeira escolha para a maioria das análises devido à elevada hidrofobicidade, estabilidade e capacidade de retenção [47].

Além da modificação da superfície da coluna, outras características são importantes para determinar sua escolha. Alguns desses atributos e seus impactos de análise são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2– Características do material de empacotamento das colunas cromatográficas

<b>Característica</b>	<b>Influência de análise</b>
Área de superfície (100 – 500 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Geralmente, quanto maior a área de superfície, maior a retenção dos analitos;
Tamanho dos poros (60 – 200 Å)	Influencia a acessibilidade da superfície; moléculas grandes com impedimento estérico podem não acessar todos os poros; poros pequenos para análise de moléculas grandes aumenta a largura do pico devido à transferência de massa mais lenta do analito.
Tamanho das partículas (2, 3, 5µm, >10µm para preparação)	Define a qualidade do material de suporte; Colunas empacotadas com partículas menores apresentam menor perda de eficiência em altas taxas de fluxo, porém a pressão de trabalho é muito mais elevada; partículas menores também estão associadas à melhora da resolução do pico e sensibilidade.
Comprimento (50 a 250 mm)	Diretamente relacionado com número de pratos teóricos (eficiência) e velocidade de análise; Colunas mais longas têm números de pratos teóricos mais altos e produzem melhor resolução com tempo de análise mais longo.

Fonte: Adaptado de DONG (2006) e KAZAKEVICH e LOBRUTTO (2007)

Todas as particularidades da fase estacionária apresentadas no quadro anterior são escolhidas durante o desenvolvimento do método, de modo a garantir a melhor separação possível dos picos cromatográficos <sup>[47]</sup>.

Em relação à fase móvel é necessário que o(s) solvente(s) escolhido(s) apresente as seguintes qualidades: elevada solubilidade para os componentes da amostra, não corrosivo para o sistema HPLC, elevada pureza e não emitir sinal no comprimento de onda trabalhado no detector. Quando possível é desejável também não inflamável e baixos custo, toxicidade e viscosidade <sup>[47,63]</sup>.

As fases móveis mais utilizadas no HPLC de fase reversa são misturas de metanol, acetonitrila, água e suas combinações. Modificadores de fase móvel, como tetrahydrofurano e dimetilsulfóxido, são aplicados para ajuste de seletividade <sup>[63]</sup>.

A escolha adequada da fase móvel irá garantir picos com boa resolução no cromatograma. A força dos solventes interfere diretamente nesse aspecto, pois refere-se à capacidade do



solvente em eluir o analito pela coluna, sendo que os solventes fracos irão apresentar maior dificuldade em transportar os componentes da amostra. Como consequência, a interação analito-fase estacionária seja melhor. Em CLAE de fase reversa, normalmente, o fator de separação e a resolução dos picos melhoram com o decréscimo da força da fase móvel. A ordem de força dos solventes é: acetonitrila > metanol > água <sup>[47]</sup>.

Após a interação do analito com a fase estacionária, o eluente é encaminhado para um detector responsável por gerar um sinal analítico que será interpretado pelo *software* e apresentado como pico no cromatograma. Os principais detectores e suas aplicações estão descritos no Quadro 3 <sup>[47]</sup>.

Quadro 3 – Principais detectores e suas aplicações

<b>Detector</b>	<b>Tipo</b>	<b>Analitos/aplicações</b>	<b>Sensibilidade</b>
Absorbância UV/Vis	Específico	Compostos com UV cromóforos	ng–pg
Matriz de fotodiodos	Específico	Compostos com UV cromóforos + espectros UV	ng–pg
Fluorescência	Muito específico	Compostos com fluorescência nativa ou com etiqueta fluorescente	fg–pg
Índice de refração	Universal	Polímeros, açúcares, triglicerídeos, ácidos orgânicos, excipientes; não compatível com análise em gradiente	0,1–10µg
Dispersão de luz por evaporação	Universal	Compostos voláteis e não voláteis; compatível com análise em gradiente.	10 ng
Espectrometria de massa	Universal	Identificação estrutural; elevada sensibilidade	pg–fg
Ressonância magnética nuclear	Universal	Elucidação estrutural e confirmação	mg–ng

Fonte: Adaptado de DONG (2006)

A detecção de absorbância por UV/VIS ocorre devido a transições de elétrons de orbitais moleculares  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  ou  $n \rightarrow \sigma^*$ . Matematicamente esse tipo de detector segue a Lei de Lambert-Beer, indicada na Equação 7 (página 34), onde a absorbância é definida como o logaritmo negativo da transmitância, que é igual à razão entre a intensidade da luz transmitida e a intensidade da luz incidente <sup>[47]</sup>.

$$A = -\log T \quad (7)$$

Onde:

A: absorbância;

T: transmitância.

Geralmente o detector UV/VIS utiliza uma lâmpada de deutério que emite a luz UV. Em equipamentos de feixe duplo, a fonte de luz é dividida para um feixe de monitoramento e outro que passa pela amostra, sendo que cada um é monitorado separadamente por um fotodiodo [47]. Devido ao aumento da condutividade observado no fotodiodo, é possível prever a potência radiante gerada pela absorção da luz UV do analito de interesse. Através de transformações matemáticas do *software* há o processamento do sinal [42].

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E PARÂMETROS AVALIADOS

### 2.5.1 Teste de hipóteses

Os testes de hipóteses se baseiam na escolha e verificação de uma suposição de um ou mais parâmetros variáveis de uma população. Assumindo a veracidade desse pressuposto, a hipótese nula ( $H_0$ ) é contraposta com a hipótese alternativa ( $H_1$ ) estatisticamente calculando a probabilidade, em um certo nível de significância ( $\alpha$ ), da hipótese nula ser fidedigna e poder ser aceita. Caso isso ocorra, afirma-se que a hipótese nula não é falsa [64,65].

O nível de significância se refere à probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando a mesma é verdadeira. Habitualmente seu valor é fixado em 5% ( $\alpha=0,05$ ), 1% ( $\alpha=0,1$ ) e 0,1% ( $\alpha=0,01$ ) [65].

Operacionalmente, após a formulação das hipóteses e escolha de  $\alpha$ , a aplicação da estatística nos dados varia de acordo com o tipo de teste aplicado (análise de média, de variância, Anova, de resíduos, etc.). Como consequência, o valor obtido e a avaliação da aceitação ou rejeição da hipótese nula também vão diferenciar de um teste para outro, como será apresentado nos próximos tópicos [65,66].

Porém, independentemente da estatística do teste, pode-se verificar a veracidade da hipótese através da probabilidade de significância ou  $p$ -valor. Assumindo  $H_0$  como verdadeira, o  $p$ -valor indica a probabilidade de se encontrar valores mais extremos do que o observado. Ou seja, quanto maior o  $p$ -valor, menores são as possibilidades da  $H_0$  ser falsa. O Quadro 4 (página 35), sugerido por Fisher, mostra uma escala da natureza das evidências a depender de  $p$ -valor [65].

Quadro 4 – Escala de significância de Fisher

<i>p</i> -valor	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001
Natureza da evidência	Marginal	Moderada	Substancial	Forte	Muito forte	Fortíssima

Fonte: Adaptado de MORETTIN e BUSSAB (2017)

Em um nível de significância de 95%, por exemplo, assume-se o *p*-valor de 0,05. Caso o *p*-valor calculado seja menor de 0,05, a hipótese nula deve ser rejeitada <sup>[65]</sup>. Para aplicação dos testes de hipóteses assume-se que os dados apresentam distribuição normal.

### 2.5.2 Regressão linear simples

As análises laboratoriais, em sua maioria, são realizadas por meio de curvas de calibração e os resultados fornecidos obtém-se pela interpolação do sinal analítico. Além disso, na estatística é necessário considerar um modelo matemático de organização dos dados para prosseguir com as avaliações pertinentes destes dados. Sendo a pressuposição do modelo é averiguada posteriormente <sup>[67]</sup>. Dessa maneira, torna-se de extrema importância a adequabilidade do modelo (linear, exponencial, etc.) aos dados do método utilizado <sup>[64]</sup>. Um dos modelos mais comumente aplicados aos métodos analíticos é a regressão linear simples, representada pela Equação 8.

$$Y_i = \alpha + \beta \times X_i + \varepsilon_i \quad (8)$$

Onde:

$Y_i$ : variável dependente estimada pela equação da regressão;

$\alpha$ : interseção;

$\beta$ : inclinação;

$X_i$ : variável independente;

$\varepsilon_i$ : resíduo da regressão.

A variável  $X_i$  apresenta valor fixo, ou seja, não está sujeita a variações aleatórias. Em contrapartida,  $Y_i$  varia a depender de  $X_i$ . Em análises cromatográficas, por exemplo, que apresentam modelo de regressão linear, espera-se que quanto maior a concentração do analito ( $X_i$ ) na solução injetada, maior será o sinal analítico ( $Y_i$ ). Desta maneira, utiliza-se a equação da regressão para obter o resultado de amostras desconhecidas em um método validado <sup>[64,65]</sup>.

O valor de  $Y_i$  é influenciado pelo  $\varepsilon_i$ , o quanto  $Y_i$  se afasta da curva. Esses resíduos possuem valores positivos ou negativos, ou seja, é o erro observado caso o modelo seja apropriado. O  $i$ -ésimo resíduo é dado pela Equação 9 [65,67].

$$\hat{\varepsilon}_i = y_i - \hat{y}_i, i = 1, 2, 3, \dots, n \quad (9)$$

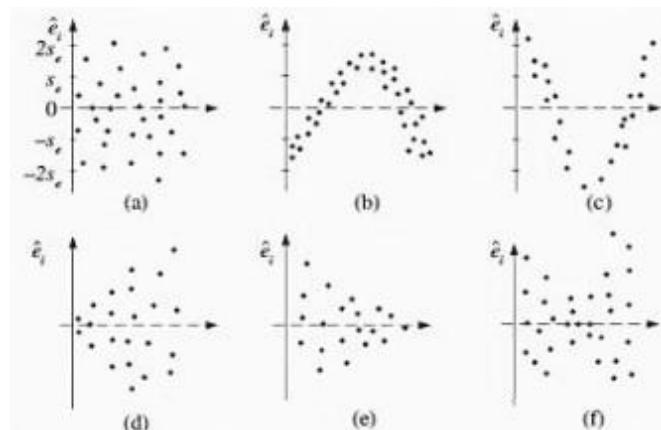
Onde,  $y_i$  é o valor observado e  $\hat{y}_i$  o valor ajustado pelo modelo.

O comportamento dos resíduos pode ser analisado por meio de um gráfico plotando-se os pares  $(x_i, z_i)$ , onde  $x_i$  é, por exemplo, a concentração dos pontos de uma curva de calibração, e  $z_i$  o resíduo padronizado, dado pela Equação 10 [64,65].

$$z_i = \frac{\hat{\varepsilon}_i}{S_e} \quad (10)$$

A distribuição dos pontos no gráfico fornece adequação ou não dos dados ao modelo proposto. Idealmente espera-se que os resíduos estejam ordenados uniforme e aleatoriamente em torno do zero sem nenhum ponto discrepante, como indica a Figura 8 (a). Nos demais gráficos percebe-se comportamentos desconformes, como inadequação ao modelo (gráficos b e c) e tendência dos resíduos (gráficos d, e, f) [64,65]. Este último aspecto demonstra a heterocedasticidade dos dados [65].

Figura 8 – Exemplos de gráficos de resíduos



Fonte: Adaptado de MORETTIN e BUSSAB (2017)

Apesar de simples e útil, a observação gráfica residual não é compatível com uma análise estatística. Neste contexto, recomenda-se a aplicação de testes para a verificação da adequabilidade do modelo e a normalidade e a aleatoriedade dos resíduos.

Quando os resíduos se comportam como previsto na Figura 8a, é um indicio de que o método analítico se adequa ao modelo de regressão linear simples. Este busca encontrar qual é a melhor curva que minimiza tais desvios. Uma maneira de realizar isso é através do método dos mínimos quadrados, que objetiva diminuir a soma dos mínimos quadrados dos resíduos de  $Y_i$ . Como resultados deste raciocínio tem-se que a curva mais apropriada passa por  $\alpha$  e  $\beta$  e seus valores são calculados conforme as Equações 11 e 12, respectivamente [64,68].

$$\alpha = \bar{y} - b\bar{x} \quad (11)$$

$$\beta = \frac{\sum_{i=1}^n \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (12)$$

Adotando o modelo de regressão linear ao método analítico, assume-se as seguintes premissas que devem ser confrontadas em testes estatísticos [67]:

- a) A relação de  $Y_i$  e  $X_i$  é linear;
- b) Os resíduos possuem média zero e são variáveis aleatórias;
- c) Os resíduos estão distribuídos dentro uma curva gaussiana;
- d) Os resíduos são homocedásticos;
- e) Os resíduos são independentes e não possuem autocorrelação.

Um aspecto importante da curva linear são os coeficientes de correlação,  $r$ , e de determinação,  $r^2$ . Apesar de ambos serem adequados, mas não suficientes, como indicadores de linearidade, eles são exigidos pela Anvisa em validação de métodos analíticos para produtos farmacêuticos e seus insumos pela RDC n° 166/2017 [53]. A fórmula de  $r$  se encontra na Equação 11 [64].

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (11)$$

Valores de  $r$  próximos de 1 indicam boa adequação dos pontos à curva linear, mas não indica, necessariamente, a adequação ao modelo [53,64]. Valores abaixo de 0,90 não são comuns na química analítica [64].

### 2.5.3 Análise de outliers

*Outliers* ou valores aberrantes são observações que se distanciam dos valores da maior parte dos dados de um conjunto. A origem da discrepância detectada pode ser a erros aleatórios,

como falhas no cálculo e na diluição, ou devido a inadequação do modelo proposto, sugerindo a reformulação do mesmo ou atestando que os dados não obedecem a distribuição normal [64,69,70].

Outro aspecto importante na avaliação de *outliers* é a sua influência na estimação pelos mínimos quadrados, alterando os valores da curva de regressão inapropriadamente. Quando proveniente de erros aleatórios, os valores aberrantes são excluídos do conjunto de dados [70].

O teste de resíduo padronizado de Jackknife ( $J_{ei}$ ), também conhecido como teste dos resíduos estudentizados (ou studentizados), é utilizado para a verificação de *outliers* nos dados brutos. A estatística do teste é trabalhada de acordo com a Equação 12 [71].

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad (12)$$

Onde:

$n - p - 1$ : número de graus de liberdade;

$p$ : número de parâmetros do modelo;

$r_i$ : resíduo padronizado. No caso específico do teste de Jackknife, o resíduo padronizado é dado pelas seguintes fórmulas das Equações 13, 14 e 15.

$$r_i = \frac{\hat{e}_i}{S_e} \quad (13)$$

$$\text{Erro padrão do resíduo} = S_e = S_{res} \times \sqrt{1 - h_1} \quad (14)$$

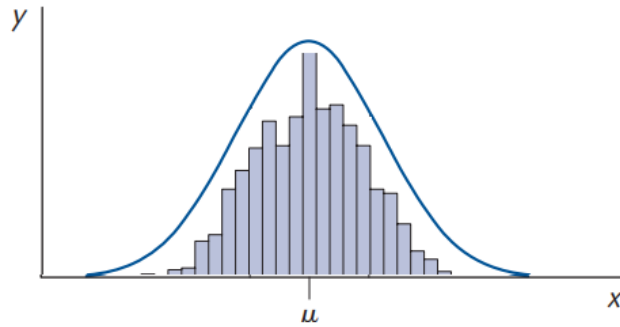
$$\text{Ponto de alavanca} = h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \quad (15)$$

A exclusão de algum valor do conjunto de dados ocorre quando  $J_{ei}$  é maior que  $t$  crítico da distribuição de  $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$  [71].

#### 2.5.4 Normalidade

A distribuição normal (ou gaussiana) se refere aos dados que se organizam dentro de uma curva em formato de sino denominada curva normal (ou de Gauss), como mostra a Figura 9 (página 39) [72].

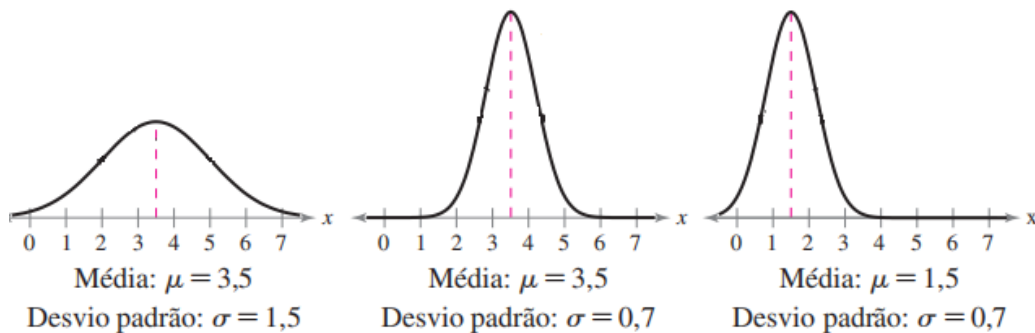
Figura 9 – Curva típica de uma distribuição normal



Fonte: Adaptado de MILLER, J. N.; MILLER, J. C. e MILLER, R. D. (2018)

A representação gráfica da figura anterior é obtida pelos valores de média e desvio padrão ( $\sigma$ ) e é caracteriza uma curva normal típica. Porém, a mesma pode sofrer alterações de altura e largura, como é mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Alterações da curva normal a depender dos valores de média e desvio padrão



Fonte: Adaptado de LARSON e FARBER (2016)

É possível perceber no gráfico que há uma diminuição da frequência à medida que  $\sigma$  aumenta. Em casos nos quais a dispersão dos pontos é elevada, o  $\sigma$  também aumenta e, como consequência, o gráfico é representado com uma banda mais larga <sup>[72,73]</sup>.

Dados brutos que não apresentam normalidade podem ser matematicamente transformados (potência, quadrática, logarítmica, raiz quadrada, etc.) para adquirirem distribuição normal ou próxima do normal <sup>[74]</sup>.

Devido à simetria da curva em torno da média, que coincide com o ponto máximo, a mediana e a moda possuem os mesmos valores. A área total sob a curva vale 1 e representa a probabilidade de a variável assumir valores reais dentro da curva. A distribuição de probabilidade é a seguinte: 68% dos valores estão entre  $\pm 1\sigma$  da média; 95% dos valores estão

entre  $\pm 2\sigma$  da média e 99,7% estão entre  $\pm 3\sigma$  da média. Os valores distantes a mais de  $3\sigma$  são *outliers* [64].

A distribuição normal também é desejável para a aplicação dos testes estatísticos que, em sua maioria, presumem a normalidade dos dados, como teste T (*Student*), teste F, Anova, regressão linear (resíduos), coeficiente de Pearson, entre outros [72,73]. A não normalidade afeta a validade dos testes de hipótese e dos intervalos de confiança [74].

O teste de Shapiro-Wilk é utilizado para confirmação da normalidade dos dados para grupos amostrais  $n \leq 50$  a partir da verificação da assimetria ou curtose (análise da proeminência da cauda e do pico) da curva de distribuição. A estatística do teste é trabalhada utilizando as Equações 16 e 17 [73]. Para amostras de distribuição normal, valor de W depende apenas do tamanho amostral e seu valor máximo é de 1 [75].

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (y_{(i)} - \bar{y})^2} \quad (16)$$

Onde b é uma constante determinada pela Equação 17:

$$b = \begin{cases} \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-i+1} (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}), & \text{se } n \text{ é par} \\ \sum_{i=1}^{(n+1)/2} a_{n-i+1} (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}), & \text{se } n \text{ é ímpar} \end{cases} \quad (17)$$

O termo  $a_{n-i+1}$  são constantes tabeladas e geradas através das variâncias, médias e covariâncias de amostra de tamanho  $n$  e distribuição normal [75].

O teste de Shapiro-Wilk fornece um teste de  $H_0$  na qual os dados são normais e a contrapõe com a  $H_1$  de que os dados não provêm de uma distribuição normal. A hipótese nula é rejeitada, para um certo nível de significância  $\alpha$ , quando  $W < W_c$ . O valor crítico de  $W_c$  é tabelado de acordo com o  $n$  e  $\alpha$ . Já para W, seu valor máximo é 1 e quanto mais próximo de 0 maior é o indicativo da não normalidade dos dados [75].

### 2.5.5 Aleatoriedade dos dados

A autocorrelação de dados diz respeito a uma correlação previsível entre a observação  $n$  e a observação  $n-1$  que ocorre quando o conjunto de dados não apresenta aleatoriedade. Essa característica não é desejável, uma vez que influencia diretamente a variância. Erros positivamente autocorrelacionados, por exemplo, subestimam a variância, tornando o intervalo de confiança menor e produzindo resultados errôneos nos testes de hipóteses [76].



O teste de Durbin-Watson verifica a autocorrelação de resíduos sucessivos a fim de averiguar a independência dos erros e contrapõe a hipótese nula de que não há autocorrelação residual com a hipótese alternativa de que os resíduos não são independentes. A estatística do teste é trabalhada atendendo à Equação 18. A hipótese nula é que não há autocorrelação dos resíduos, ou seja, os mesmos são independentes,  $\rho_s = 0$  é confrontada com  $\rho_s = \rho$  ( $\rho \neq 0$  e  $\rho < 1$ ), onde  $\rho$  é o parâmetro de autocorrelação [67,77].

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (y_i - \widehat{y}_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (18)$$

Os valores de  $d$  sempre estarão entre 0 a 4 e a partir dele é possível aceitar ou rejeitar a hipótese nula [78], conforme mostra o Quadro 5. Os símbolos  $d_U$  e  $d_L$  representam os limites críticos superior e inferior. Esses valores dependem do nível de significância do teste, número de variáveis independentes e o número de replicatas e são tabelados, podendo também ser estimados [53].

Quadro 5 – Interpretação dos resultados do teste de Durbin-Watson

Hipóteses	Valor de $d$	Resultado	Hipótese nula
Hipótese nula: $H_0: \rho=0$	$d_L < d < d_U$	Teste inconclusivo	-
	$d < d_L$	Há autocorrelação positiva	Rejeitada
	$d > d_U$	Não há correlação	Aceita
Hipótese alternativa: $H_1: \rho > 0$	$d = 2$	Não há autocorrelação	Aceita
	$d = 0^*$	Perfeita autocorrelação positiva	Rejeitada
	$d = 4^*$	Perfeita autocorrelação negativa	Rejeitada
Hipótese nula: $H_0: \rho=0$	$d_L < d < d_U$ ou $d_L < 4-d < d_U$	Teste inconclusivo	-
	$d < d_L$ ou $4-d < d_L$	Há autocorrelação	Rejeitada
	$d > d_U$ e $4-d > d_U$	Não há correlação	Aceita
Hipótese nula: $H_0: \rho=0$	$4 - d_U < d < 4 - d_L$	Teste inconclusivo	-
	$d > 4 - d_L$	Há autocorrelação negativa	Rejeitada
	$d > 4 - d_U$	Não há correlação	Aceita

\* Quanto mais o valor de  $d$  se afasta de 2 e se aproxima de 0 ou 4, maior é a autocorrelação dos dados.

Fonte: Adaptado de ELLISON, BARWICK e FARRANT (2009) e GOODING e HIBBERT (2006)

O teste de Durbin-Watson só pode ser realizado para erros que apresentam distribuição normal com média zero e variância constante. É necessário também que as variáveis independentes não sejam aleatórias [67].

### 2.5.6 Análise de Variância

A variância ( $\sigma^2$ ) é calculada pelo desvio padrão ao quadrado. O teste F é utilizado para comparar duas variâncias ( $\sigma_1^2$  e  $\sigma_2^2$ ) experimentalmente observadas, podendo ser aplicado, por exemplo, para comparação de precisão de métodos analíticos diferentes, de analistas e técnicas de amostragem. [65,66].

Usualmente assume-se que  $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  e  $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ , porém outras hipóteses alternativas podem ser aplicadas, como indicado no Quadro 6. A estatística do teste é alterada nos casos de análises unilateral ou bicaudal [66].

Quadro 6– Hipóteses e estatísticas do teste F

Hipótese	Teste estatístico	Caudas	Graus de liberdade
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$ , para $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$	2	$n_1 - 1$ , para $\sigma_1^2$ $n_2 - 1$ , para $\sigma_2^2$
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ $H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$	$F = \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2}$ , para $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$	1	
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ $H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$	$F = \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2}$ , para $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$	1	

Fonte: Adaptado de MILLER, J. N.; MILLER, J. C. e MILLER, R. D. (2018) e PINO (2014)

É observado que valores de  $F_{\text{calculado}}$  próximos de 1, indicam a aceitação da  $H_0$ . Para um certo nível de significância,  $H_0$  é aceita para  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ , sendo este tabelado e dependente do tamanho amostral,  $\alpha$  e o número de caudas. O resultado do teste também pode ser verificado pelo cálculo de  $p$ -valor nos *softwares* de estatística e comparado com  $\alpha$ . Valores de  $F_{\text{calculado}}$  diferentes de 1 podem ocorrer devido a variâncias aleatórias, porém, se o valor for muito elevado, há outras causas envolvidas [64].

Apesar de útil, o teste F tem a limitação de avaliar apenas dois conjuntos de dados ou dois parâmetros simultaneamente. Em situações que é preciso analisar as influências de mais de um fator isolado em conjuntos de dados diferentes aplica-se a análise de variância (Anova- do inglês *analysis of variance*). Esse teste estatístico permite separar as fontes de variação de uma análise, como metodologias e analistas diferentes, temperatura e concentração, e estimar a

influência desses fatos nos resultados de medição. Para a realização do teste é necessário que os dados sejam normalmente distribuídos [66,68].

Uma das aplicações do Anova é o teste de significância da curva de regressão linear e avaliação do desvio de linearidade com a estatística do teste F [66,68].

### 2.5.7 Análise de médias

O teste T pode ser aplicado para comparar a média de um conjunto de dados com valor declarado, as médias de dois conjuntos de dados independentes e as amostras pareadas sem replicatas. Em cada uma das situações, a estatística do teste varia. Os Quadros 7 e 8 (página 44) resumem as possibilidades e indicam as fórmulas utilizadas em cada uma delas.

Quadro 7 – Hipóteses e estatísticas do teste T

Tipo de teste	Hipótese	Teste estatístico	Caudas	Graus de liberdade ( $\nu$ )
Comparar a média de um conjunto de dados com valor declarado	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 \neq \mu_2^2$	$t = \frac{ \bar{x} - \mu_0 }{s \times \sqrt{n}}$	2	$n - 1$
	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 > \mu_2^2$	$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s \times \sqrt{n}}$	1	
	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 < \mu_2^2$	$t = \frac{\mu_0 - \bar{x}}{s \times \sqrt{n}}$	1	
Comparar as médias de dois conjuntos de dados independentes	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 \neq \mu_2^2$	$t = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{S_{diff}}$	2	Ver Quadro 8
	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 > \mu_2^2$	$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{diff}}$	1	
	$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2$ $H_1: \mu_1^2 < \mu_2^2$	$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{diff}}$	1	
Comparar amostras pareadas sem replicatas	$H_0: \mu_d = 0$ $H_1: \mu_d \neq 0$	$t = \frac{ \bar{d} }{S_d/\sqrt{n}}$ *	2	$n - 1$
	$H_0: \mu_d = 0$ $H_1: \mu_d > 0$	$t = \frac{\sum (a_i - b_i)/n}{S_d/\sqrt{n}}$ **	1	$n - 1$
	$H_0: \mu_d = 0$ $H_1: \mu_d < 0$	$t = \frac{\sum (b_i - a_i)/n}{S_d/\sqrt{n}}$	1	$n - 1$

\*  $d = a_i - b_i$ ,  $\bar{d}$  é a média da diferença dos dados;  $S_d$ : é o desvio padrão da diferença dos dados;

\*\*  $a_i$  e  $b_i$  são os dados individuais das amostras pareadas A e B, respectivamente.

Fonte: Adaptado de PINO (2014) e GOODING e HIBBERT (2006)

Para um acerto nível de significância,  $H_0$  é aceita para  $t_{calculado} > t_{crítico}$ , sendo este tabelado e dependente do número de graus de liberdade,  $\alpha$  e o número de caudas. O resultado do teste

também pode ser verificado através do cálculo de  $p$ -valor nos softwares de estatística e comparado com  $\alpha$  [66].

Quadro 8 – Desvio padrão agrupado e graus de liberdade para comparação de médias de dois conjuntos de dados independentes para o teste T

Tipo de teste	Desvio padrão agrupado ( $S_{diff}$ )	Graus de liberdade ( $v$ )
Comparar as médias de dois conjuntos de dados independentes com variâncias iguais	$S_{diff} = \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times \frac{(n_1 - 1) \times S_1^2 + (n_2 - 1) \times S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$	$v = n_1 + n_2 - 2$
Comparar as médias de dois conjuntos de dados independentes com variâncias diferentes	$S_{diff} = \sqrt{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}$	$v = \frac{\left(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2\right)^2}{\frac{\left(S_1^2/n_1\right)^2}{n_1-1} + \frac{\left(S_2^2/n_2\right)^2}{n_2-1}}$

Fonte: Adaptado de ELLISON, BARWICK e FARRANT (2009) e GOODING e HIBBERT (2006)

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido bórico PA Vetec (Lote DCBD1524V), ácido clorídrico PA Química Moderna (Lote 11411), amido Synth (Lote 232659), bromato de potássio, brometo de potássio Êxodo (Lote 2208094846), carbonato de sódio anidro Merck (Lote A1396332), catecol Dinâmica (Lote 117428), cloreto de potássio Scharlab (Lote 15195002), clorofórmio PA Supelco (Lote K54622045), m-cresol Sigma-Aldrich (Lote BCCJ0391), dicromato de potássio Merck (Lote K50664264), fenil-1-dimeteil-2,3-amino-4-pirazolona-5-(4-aminoantipirina) Sigma-Aldrich (Lote BCCD7285), fenol PA Êxodo (Lote 2010276861), ferricianeto de potássio Êxodo (Lote 2006303833), iodeto de potássio InLab (Lote 856578), hidróxido de sódio PA ACS Científica (Lote 202202527), metanol PA Supelco (Lote I1099709),  $\alpha$ -metilestireno Sigma-Aldrich (Lote MKCM3639), tiosulfato de sódio penta-hidratado Neon (Lote 53282).

A água ultrapurificada e purificada foram purificadas no Laboratório do Serviço de Controle Físico Químico da Funed pelo sistema de purificação de água Millipore Integral A-10 TAG SPAFQ-01A com qualificação vigente até 11/2023.

#### 3.2 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- HPLC Shimadzu CBM-20A, com módulo dispensador de solvente LC-20AT, sistema degaseificador em linha DGU-20A5 e detector UV-VIS com arranjo de diodo SPD-M20A TAG HPL-00018 com calibração vigente até 06/2024;
- HPLC Merck/WRV Hitachi, amostrador automático L2200, forno de coluna L2300M e detector UV/VIS L2400 TAG HPLFQ-02 com calibração vigente até 03/2024;
- Balança analítica Mettler Toledo X 205 DU TAG BALFQ-01A com calibração vigente até 05/2023;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 TAG ESPFQ-04A com calibração vigente até 04/2024.

### 3.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

As análises da validação analítica foram realizadas no laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico – SCFQ da Fundação Ezequiel Dias seguindo as exigências da RDC 166/2017 e orientações do documento INMETRO-DOQ-CGCRE-008/2003. Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

#### 3.3.1 Análise estatística e critérios de aceitação

Em todos os ensaios realizados (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LD e LQ), avaliou-se a presença de *outliers* e a normalidade e a correlação residuais. Outras características estatísticas foram verificadas especificamente em cada um dos parâmetros analíticos e estão descritas em cada figura de mérito.

Realizou-se a análise estatística utilizando o *software* R<sup>TM</sup>.

Em todos os ensaios, a avaliação de *outliers* foi realizada através do teste de Resíduos Padronizado de Jackknife ( $\alpha=0,05$ ) para as curvas de calibração seletividade, linearidade, precisão e exatidão e limite de quantificação. Excluiu-se, no máximo, 22% dos valores obtidos, considerando que não fosse excluída um nível de curva de calibração [79]. Nos dados amostrais que não representam uma curva, foi realizado o teste de Grubbs para identificação de *outliers*.

Para a avaliação da normalidade dos resíduos, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, com resultados satisfatórios para *p*-valor maior que 0,05, ou seja, os resíduos seguem a distribuição normal para um nível de confiança de 95%.

Em todos os ensaios, avaliou-se a aleatoriedade dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson, com resultado satisfatório compreendido entre *dL* e *4-dL* ( $\alpha=0,05$ ), ou seja, não há correlação positiva ou negativa entre os resíduos.

#### 3.3.2 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram analisadas soluções de concentrações de padrão de fenol igualmente espaçadas entre 5,0 a 9,0 mg L<sup>-1</sup>, correspondentes aos níveis 1 ao 5. A seletividade ocorreu em duas etapas: na primeira foram comparados os teores de soluções padrão de fenol obtidos com o método a ser validado e com outros métodos de quantificação de fenol. Na segunda etapa, comparou-se os teores de fenol obtidos de soluções padrão e de soluções padrão contaminadas com impurezas no método cromatográfico a ser validado.

### 3.3.2.1 Parte I – Comparação de método

Na primeira etapa da seletividade, foram analisadas as soluções padrões de fenol pelo método cromatográfico a ser validado e por metodologias já validadas e utilizadas em laboratório: a titulação iodométrica de Kopperchaar (método farmacopeico) e a espectrofotometria na região do UV-visível. Como mostrado esquema da Figura 11 (página 48), utilizou-se as mesmas soluções estoque nas três metodologias. A fim de garantir maior número amostral para os testes estatísticos, realizou-se a análise em quintuplicata de amostras independentes.

Analisou-se as soluções em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 546 nm, utilizando cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico, seguindo as instruções do equipamento e utilizando a solução branco para zerar o aparelho.

Já as soluções em análise cromatográfica foram realizadas conforme as condições experimentais descritas no Quadro 9 (página 48).

O preparo das soluções utilizadas para a titulação iodométrica de Kopperchaar e a espectrofotometria na região do UV-visível estão descritas no Apêndice A e B, respectivamente.

Na titulação iodométrica, o cálculo de fenol é obtido através da Equação 19. Já na cromatografia e na espectrofotometria é necessária uma curva de calibração e equação da reta para interpolar o valor da área/absorbância do fenol e mensurar sua concentração na amostra analisada.

$$\% Fenol = \frac{(V_b - V_a) \times f_c \times 1,569 \times 5000}{P \times 0,25 \times (100 - \% H_2O)} \quad (19)$$

Onde:

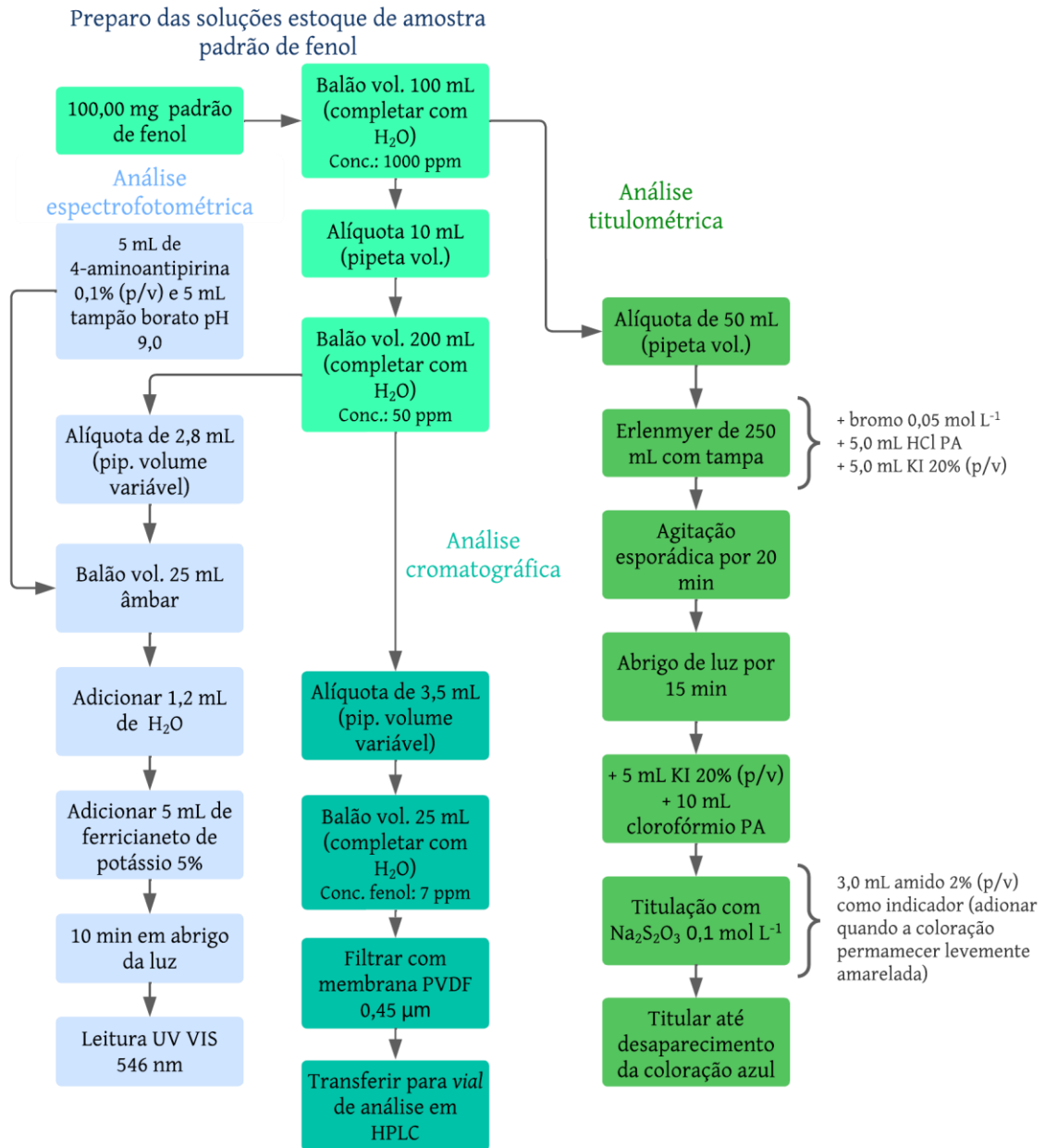
V<sub>a</sub>: volume gasto de tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> nas amostras, em mL;

V<sub>b</sub>: volume gasto de tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> no branco, em mL;

f<sub>c</sub>: fator de correção do tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>;

P: massa da matéria-prima/padrão, em mg;

% H<sub>2</sub>O: teor de umidade na matéria-prima/padrão.

Figura 11– Fluxograma do teste de seletividade gerado no *software* LucidChart™

Fonte: adaptado de SILVA (2023) e Anvisa (2019)

Quadro 9 – Condições experimentais da análise cromatográfica

Condição	Descrição
Volume de injeção	20,0 µL
Fase Móvel	Solução isocrática de água/metanol 50:50 v/v
Taxa de fluxo	1,0 mL/min
Temperatura do forno	35 °C
Fase estacionária	Coluna Merck C18, 250 x 4,6; tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poro de 100 Å, 400 m <sup>2</sup> /g
Comprimento de onda	270 nm

Fonte: adaptado de SILVA (2023)



A curva de calibração do método cromatográfico foi realizada de acordo com a diluição de volumes da solução padrão de fenol de 50 mg L<sup>-1</sup>, conforme a Tabela 2, em balões volumétricos de 25,00 mL.

Tabela 2 – Preparo das soluções da curva de calibração do método cromatográfico.

Nível	Volume da solução padrão de fenol de 50 mg L <sup>-1</sup> (mL)	Concentração final de fenol (mg L <sup>-1</sup> )
1	2,50	5,0
2	3,00	6,0
3	3,50	7,0
4	4,00	8,0
5	4,50	9,0

Fonte: adaptado de SILVA (2023)

As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 25,00 mL identificados de 1 a 5 correspondentes aos cinco níveis de concentração da curva. Adicionou-se, em cada balão, o volume aproximado de 15,0 mL de água ultrapurificada e, posteriormente, os volumes da solução padrão de fenol 50 mg L<sup>-1</sup> indicados na Tabela 2. Completou-se o volume de todos os balões volumétricos com água ultrapurificada e homogeneizou-se os mesmos.

Foram preparadas duas curvas de calibração do método espectrofotométrico conforme a Tabela 3. As soluções foram preparadas em balões volumétricos âmbar de 25,00 mL identificados de 1 a 5 correspondentes aos cinco níveis de concentração da curva, adicionando-se os reagentes na seguinte ordem: tampão borato pH 9,0, solução de 4-aminoantipirina 0,1% m v<sup>-1</sup>, solução padrão de fenol de 50,00 mg L<sup>-1</sup>, água ultrapurificada e ferricianeto de potássio 5% m v<sup>-1</sup>. Os volumes adicionados de cada solução estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 – Preparo das soluções da curva de calibração do método espectrofotométrico

Nível	Tampão borato pH 9,0 (mL)	4-aminoantipirina 0,1% m v <sup>-1</sup> (mL)	Solução padrão de fenol de 50 mg L <sup>-1</sup> (mL)	Volume de água ultrapurificada (mL)	Ferricianeto de potássio 5% m v <sup>-1</sup> (mL)
Branco	5,0	5,0	0,0	5,0	5,0
1	5,0	5,0	2,0	3,0	5,0
2	5,0	5,0	2,4	2,6	5,0
3	5,0	5,0	2,8	2,2	5,0
4	5,0	5,0	3,2	1,8	5,0
5	5,0	5,0	3,6	1,4	5,0

Fonte: adaptado de Anvisa (2019)

Salienta-se que nas soluções preparadas para leitura espectrofotométrica é formado um composto fotossensível pela reação entre 4-aminoantipirina e fenol na presença de ferricianeto de potássio em pH alcalino. Esse mesmo composto, que será quantificado, deve ser preservado. Por isso, após o período de 10 minutos, todas as soluções foram analisadas imediatamente.

A análise estatística consistiu na comparação dos teores de fenol obtidos em cada método (cromatográfico, titulação iodométrica de Kopeerchaar e espectrofotométrico na região do UV-visível). Para isso aplicou-se os testes F e T (Student) para avaliar as variâncias e as médias dos resultados. Detalhes estão apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 – Descrição dos testes F e T (Student) realizados na Parte I da Seletividade

<b>Grupos amostrais</b>	<b>Teste</b>	<b>Hipótese nula (H0)</b>	<b>Hipótese alternativa (Ha)</b>
Valores de teor de fenol obtidos com o método a ser validado e os valores de teor de fenol obtidos pelo método titulométrico;	Teste F	A variância do teor de fenol obtido através do método cromatográfico é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método titulométrico;	A variância do teor de fenol obtido através do método cromatográfico não é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método titulométrico;
	Teste T (Student)	O teor de fenol obtido através do método cromatográfico é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método titulométrico;	O teor de fenol obtido através do método cromatográfico não é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método titulométrico;
Valores de teor de fenol obtidos com o método a ser validado e os valores de teor de fenol obtidos pelo método espectrofotométrico;	Teste F	A variância do teor de fenol obtido através do método cromatográfico é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;	A variância do teor de fenol obtido através do método cromatográfico não é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;
	Teste T (Student)	O teor de fenol obtido através do método cromatográfico é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;	O teor de fenol obtido através do método cromatográfico não é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;
Valores de teor de fenol obtidos com o método titulométrico e os valores de teor de fenol obtidos pelo método espectrofotométrico;	Teste F	A variância do teor de fenol obtido através do método titulométrico é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;	A variância do teor de fenol obtido através do método titulométrico não é equivalente à variância do teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;
	Teste T (Student)	O teor de fenol obtido através do método titulométrico é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;	O teor de fenol obtido através do método titulométrico não é equivalente ao teor de fenol obtido pelo método espectrofotométrico;

Fonte: de autoria própria.

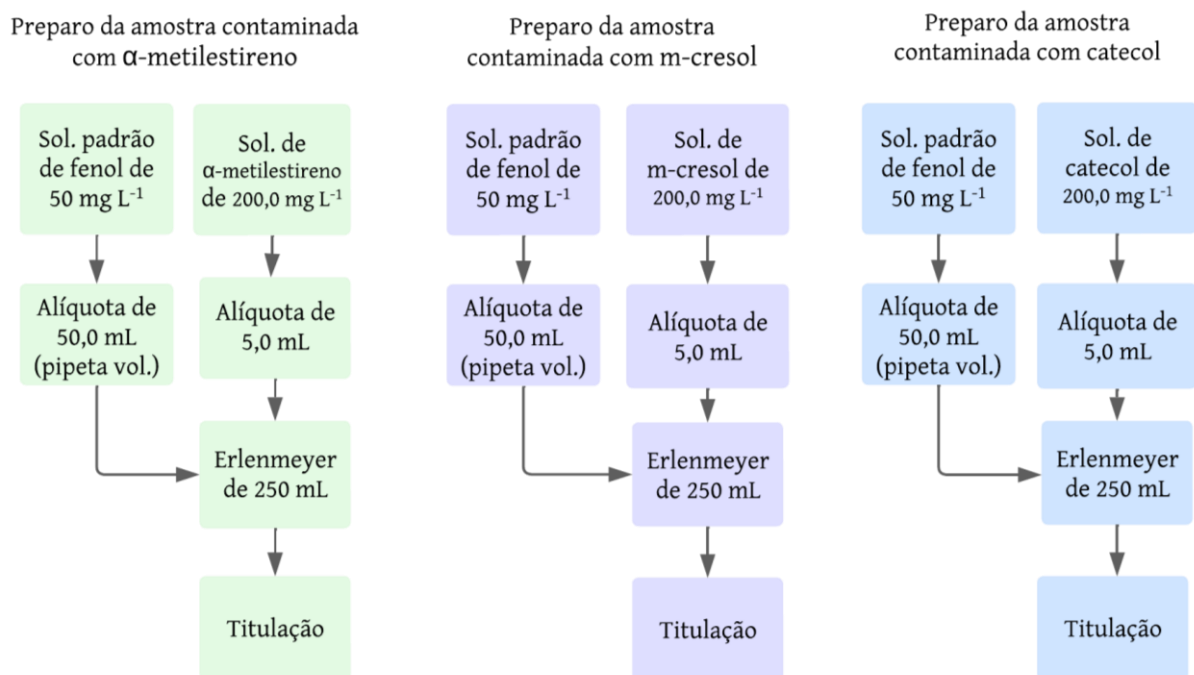
Para um nível de confiança de 95%, as hipóteses nulas foram aceitas para  $p$ -valor  $> 0,05$  e rejeitadas para  $p$ -valor  $< 0,05$ .

### 3.3.2.2 Parte II – Quantificação de fenol frente às impurezas

Nessa etapa da seletividade, avaliou-se o teor de fenol obtido no método cromatográfico em soluções com padrão de fenol e soluções com padrão de fenol contaminadas com impurezas típicas dessa matéria-prima e que possuem estrutura química similar.

Foram utilizadas as mesmas soluções estoque de fenol para os dois tipos de amostra (não contaminada e contaminada com impureza), como indica os esquemas da Figura 12 e Figura 13 (página 52) das análises titulométrica e cromatográfica, respectivamente. A fim de garantir maior número amostral para os testes estatísticos, realizou-se a análise em quintuplicata de amostras independentes.

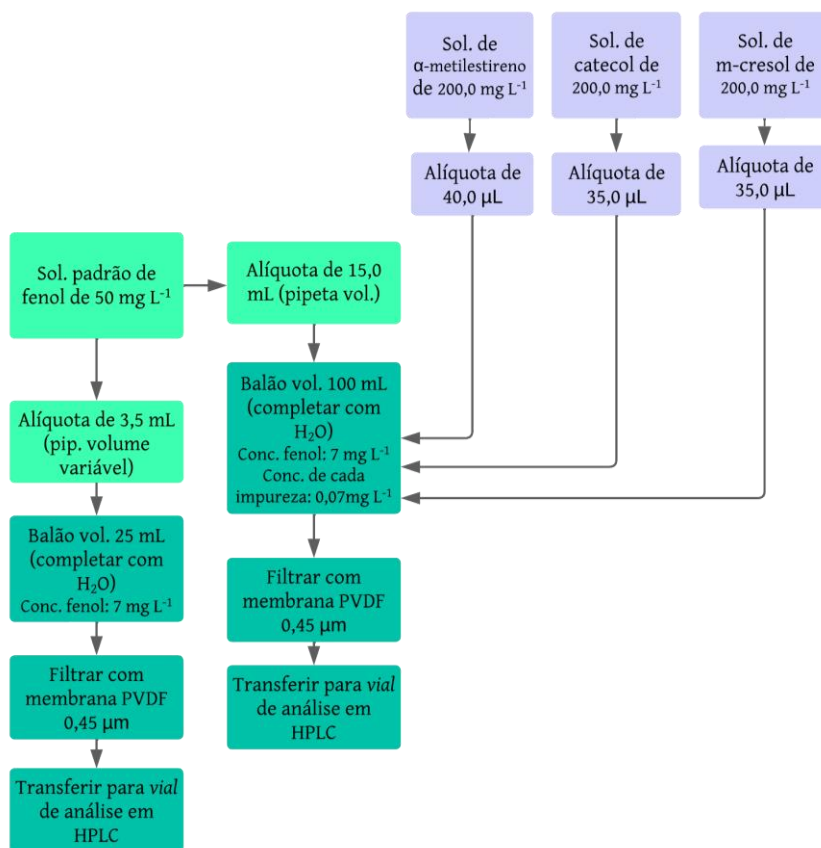
Figura 12- Fluxograma da análise titulométrica de comparação de método no *software* LucidChart™



Fonte: autoria própria

Preparou-se 4 curvas de calibração do método cromatográfico, seguindo instruções da Parte I da seletividade e Tabela 3. Essas mesmas curvas devem ser utilizadas para verificar a linearidade do método a ser validado.

Figura 13– Fluxograma da análise cromatográfica de comparação de método no *software* LucidChart™



Fonte: de autoria própria

A titulação foi realizada adicionando-se 5,0 mL de ácido clorídrico e 50,0 mL de bromo 0,05 mol L<sup>-1</sup> ao Erlenmeyer. O mesmo foi tampado, agitado ocasionalmente durante 20 minutos e acondicionado ao abrigo de luz por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5,0 mL de iodeto de potássio 20% m v<sup>-1</sup> e 10,0 mL de clorofórmio PA. Titulou-se a solução com tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> até a coloração da solução permanecer levemente amarelada, momento no qual adicionou-se 3,0 mL de solução de amido 2% m v<sup>-1</sup>. Continuou-se a titulação com agitação vigorosa até desaparecimento da coloração azul.

Nas amostras analisadas por cromatografia, calculou-se o DPR entre os tempos de retenção do fenol no cromatograma das soluções de amostra padrão de fenol com os tempos de retenção de fenol das soluções de amostra de fenol contaminada com impureza combinada. O DPR obtido entre os tempos de retenção não deve ser maior que 2%. Espera-se que os picos de fenol e cada impureza analisada sejam obtidos com resolução satisfatória, ou seja, que os picos sejam distinguíveis entre si.

Comparou-se os teores de fenol nas amostras padrão de fenol e nas amostras de fenol contaminada com impureza combinada utilizando-se os testes F e T (Student) para avaliar as variâncias e as médias dos resultados obtidos separadamente em cada uma das metodologias. Os testes foram aplicados para um nível de confiança de 95%.

### 3.3.3 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, preparou-se 3 curvas de calibração do método cromatográfico, seguindo instruções da seletividade da Tabela 2.

A verificação da regressão e do desvio de linearidade foi realizada pelo teste Anova. Os critérios de aceitação, assim como os demais aspectos analisados na linearidade estão descritos no Quadro 11.

Quadro 11 – Parâmetros avaliados na análise estatística da linearidade

Parâmetro avaliado	Critério de aceitação
Avaliação da regressão (teste Anova)	$F_{\text{calculado}}$ deve ser maior que o $F_{\text{crítico}}$ (regressão deve ser significativa)
Avaliação do desvio da linearidade (teste Anova)	$F_{\text{calculado}}$ deve ser menor ou igual ao $F_{\text{crítico}}$ (não há desvio de linearidade)
Coefficiente de correlação (r)	Acima de 0,990
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	Acima de 0,980
Coefficiente angular	Significativamente diferente de zero.

Fonte: adaptado de Anvisa (2017)

Os dados foram processados no *software* R™.

### 3.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em condições de precisão intermediária em dois dias distintos com analistas e cromatógrafos diferentes, como indica o Quadro 12.

Para cada dia de ensaio, foram analisadas sextuplicatas de soluções independentes de concentrações de 5, 7 e 9 mg L<sup>-1</sup>, correspondentes aos níveis 1, 3 e 5, respectivamente, como é demonstrado no esquema da Figura 14 (página 54). Preparou-se uma curva de calibração

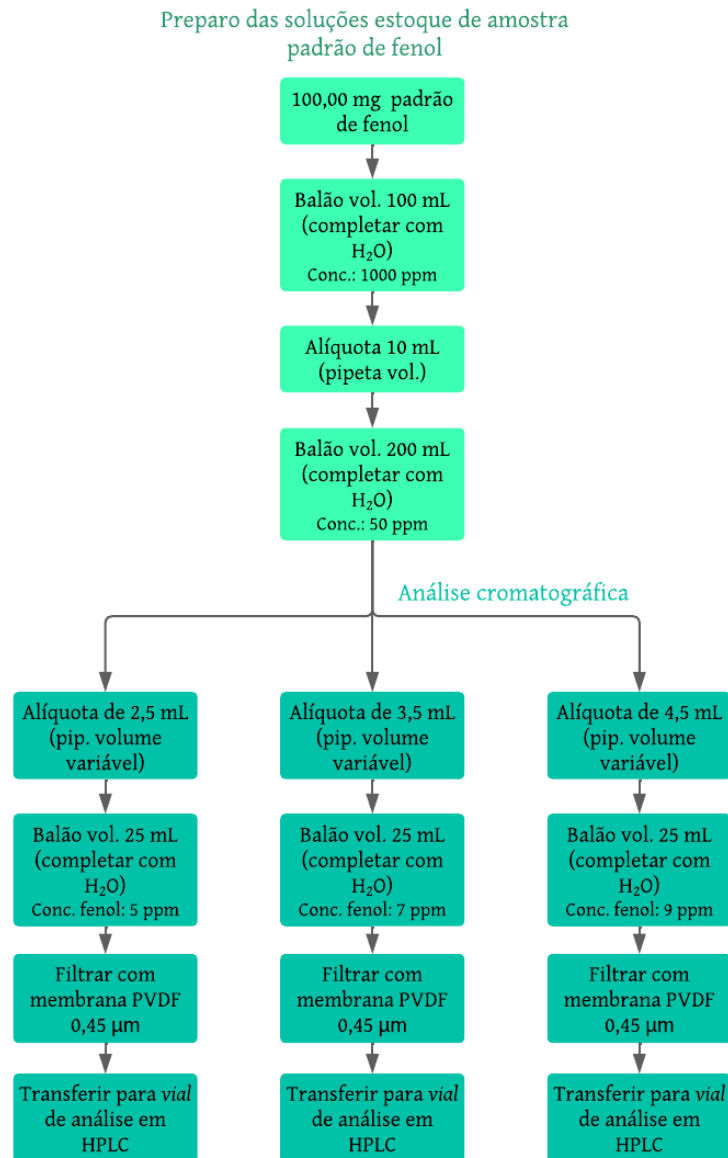
completa, com soluções dos níveis de 1 a 5, de acordo com as instruções da seletividade e Tabela 2.

Quadro 12 – Resumo das condições de análise de precisão intermediária

	Dia 1	Dia 2
Analista 1	Experimento 1	
Analista 2		Experimento 2
Equipamentos	Cromatógrafo líquido 1	Cromatógrafo líquido 2

Fonte: de autoria própria.

Figura 14– Fluxograma dos testes de precisão e exatidão gerado no *software* LucidChart™



Fonte: de autoria própria.

Elaborou-se o gráfico da curva de calibração e, com a equação da reta, interpolou-se o valor da área de cada amostra para mensurar a concentração de fenol.

As recuperações, por nível de concentração, considerando-se os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 da avaliação da precisão, foram calculadas através da Equação 20.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_e \times 100}{C_t} \quad (20)$$

Onde:

C<sub>e</sub>: Concentração encontrada;

C<sub>t</sub>: concentração teórica.

Considerando as concentrações das soluções e o preconizado pelo Apêndice F: Diretrizes para Requisitos de Desempenho do Método da Associação de Químicos Analíticos Oficiais<sup>[80]</sup>, avaliou-se a recuperação de fenol nos níveis testados. A recuperação foi calculada conforme indicado no tópico 3.4.3, considerando que todos os dados como advindos do mesmo conjunto amostral. A recuperação em cada nível deve ser compreendida no intervalo de 80 a 110%.

Calculou-se também o DPR por nível de concentração considerando os dados de ambos analistas como advindos do mesmo conjunto amostral. O valor de DPR deve ser menor ou igual ao DPR máximo aceitável de 7,3%.

### 3.3.5 Limites de Detecção e Quantificação

Para calcular os limites de detecção e de quantificação do método utilizou-se os resultados obtidos no nível 1 da curva combinada do teste de linearidade.

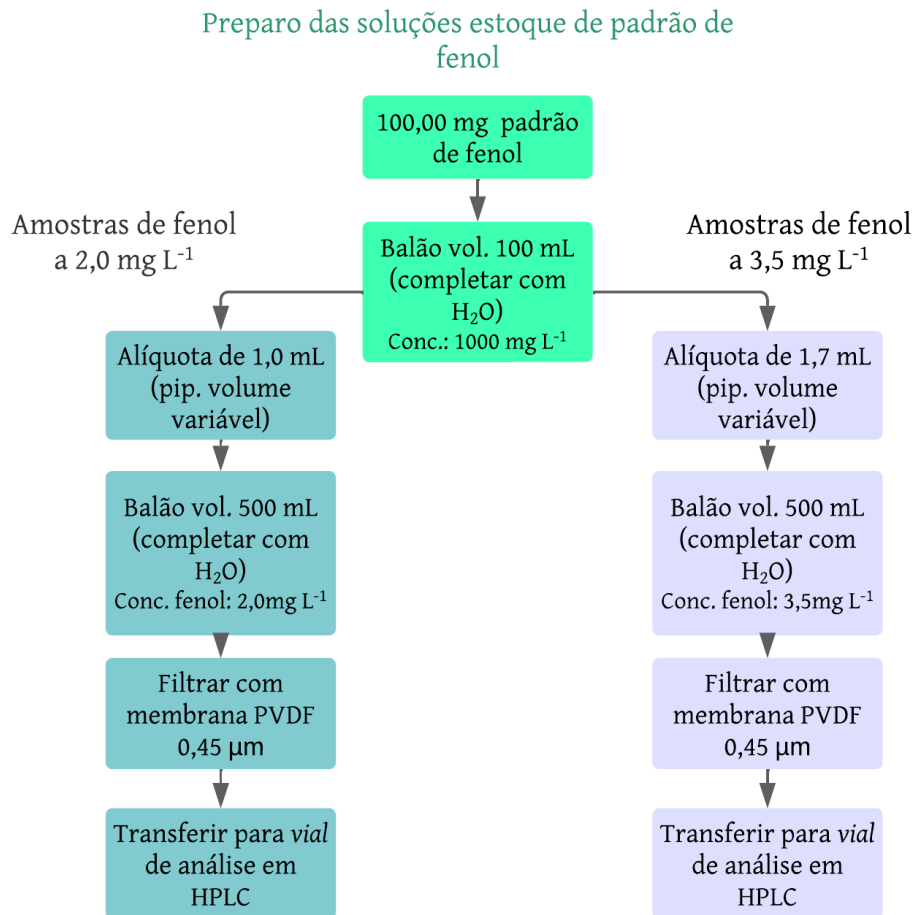
O limite de detecção e quantificação foram calculados conforme as equações 5 (página 28) e 6 (página 29), respectivamente.

A fim de verificar os valores obtidos de limite quantificação, foram preparadas 7 soluções independentes de padrão de fenol nas concentrações de LQ, como é apresentado no fluxograma da Figura 15 (página 56). Analisou-se também 7 soluções com concentração de 2,00 mg L<sup>-1</sup>.

Preparou-se uma curva de calibração completa, com soluções dos níveis de 1 a 5, de acordo com as instruções da seletividade e Tabela 2. Plotou-se o gráfico da curva de calibração e, com a equação da reta, interpolar-se o valor da área de cada amostra para mensurar a concentração de fenol.

Considerando as concentrações das soluções e o preconizado pelo Apêndice F: Diretrizes para Requisitos de Desempenho do Método da Associação de Químicos Analíticos Oficiais [80] avaliou-se a recuperação de fenol nos limites testados, nas quais devem estar compreendidas entre 80 a 110%. Calculou-se também o DPR que deve ser menor ou igual 7,3%.

Figura 15 – Fluxograma para verificação dos LD e LQ gerado no *software* LucidChart™



Fonte: de autoria própria.



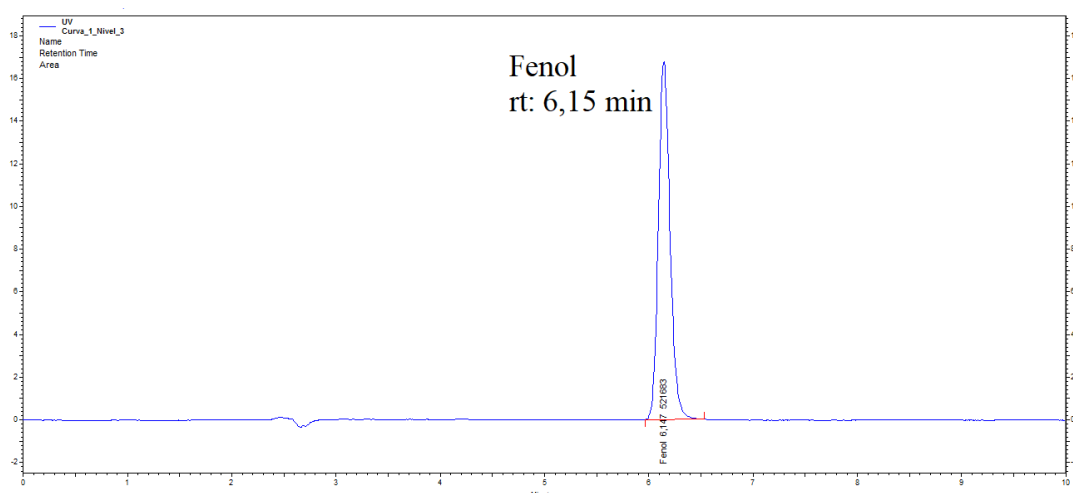
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SELETIVIDADE – PARTE I: COMPARAÇÃO DE MÉTODO

A avaliação da seletividade consistiu na comparação entre os teores de fenol obtidos de 5 amostras independentes de padrão nos métodos a ser validado (cromatográfico), o método espectrofotométrico na região do UV-VIS e o titulométrico (iodometria de Kopperchaar/método farmacopeico). Através da comparação desses resultados, é possível verificar se o método cromatográfico fornece resultados confiáveis da concentração do analito de interesse.

O cromatograma referente ao padrão de fenol na concentração aproximada de  $7,0 \text{ mg L}^{-1}$  é mostrado na Figura 16.

Figura 16 – Cromatograma do padrão de fenol

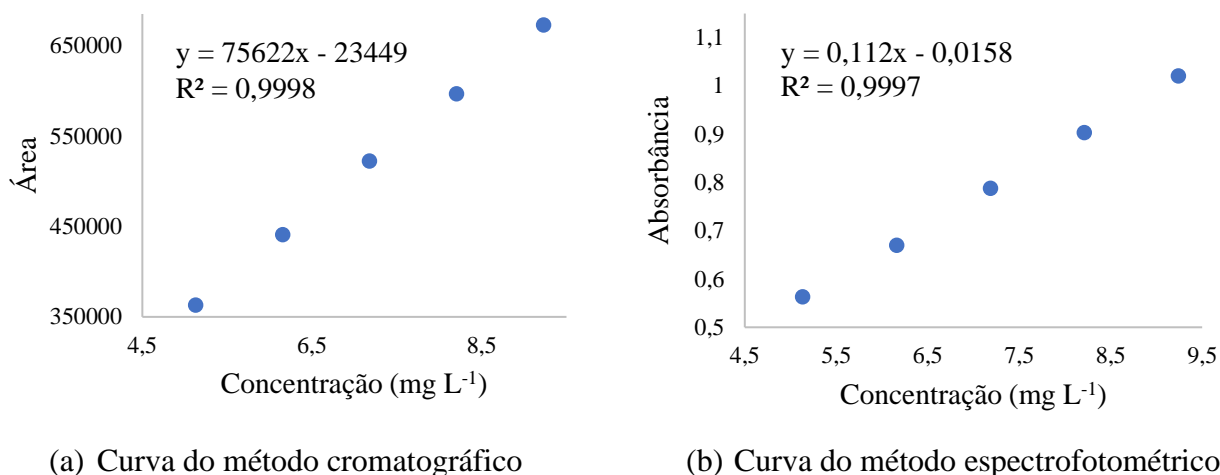


Fonte: de autoria própria.

O tempo de retenção do fenol foi em 6,15 minutos. Visualmente percebe-se uma boa simetria do pico, confirmado pelo *tailing fator* de 1,18, e sem interferência de outras substâncias, comprovado pela pureza de pico de 99,76%.

A cromatografia e a espectrofotometria utilizam a interpolação do sinal analítico em uma curva de calibração para mensurar a concentração do analito nas soluções analisadas. A Figura 17 (página 58) expõe as curvas utilizadas para o doseamento do fenol nessa etapa da validação.

Figura 17 – Curvas de calibração utilizadas para avaliação da seletividade



Fonte: gráficos gerados pelo *software* Microsoft Excel<sup>®</sup>.

O método espectrofotométrico, já consolidado para a quantificação de fenol, atende ao modelo linear. Como já era esperado, na Figura 17b, observa-se sua curva de calibração em uma linha de regressão indicando a relação linear, com coeficiente de determinação de 0,9997.

Do mesmo modo, o método a ser validado demonstra adequabilidade ao modelo linear (Figura 17a), com  $r^2$  de 0,9998. Este comportamento também era previsto, uma vez que o método cromatográfico já foi validado na mesma faixa de trabalho e mesmas condições experimentais para a quantificação de fenol em soros hiperimunes par uso humano [79].

As análises de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e de autocorrelação (teste de Durbin-Watson) dos resíduos auxiliaram na avaliação das curvas de calibração. Os resultados dos testes estatísticos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes estatísticos para avaliação das curvas de calibração

Teste	Critério de aceitação	Análise	Resultado
Shapiro-Wilk	$p$ -valor >0,05	Cromatográfica	0,1143
		Espectrofotométrica	0,8721
Durbin-Watson	$p$ -valor >0,05	Cromatográfica	0,1768
		Espectrofotométrica	0,2528

Fonte: de autoria própria.

Os  $p$ -valores obtidos em todos os testes, tanto para a análise da curva de calibração cromatográfica quanto a curva espectrofotométrica, foram acima de 0,05, certificando que os

dados seguem a distribuição normal e as variações são independentes para um nível de significância de 95%. Dessa maneira, as curvas obtidas foram consideradas satisfatórias para o doseamento do fenol nas amostras analisadas.

Os resultados de teores de fenol das 5 amostras independentes de padrão de fenol analisados nos três métodos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de teores de fenol

<b>Amostra</b>	<b>Análise cromatográfica</b>	<b>Análise espectrofotométrica</b>	<b>Análise titulométrica</b>
1	99,98	99,64	99,46
2	100,07	99,20	99,90
3	98,88	98,14	99,41
4	99,90	100,22	99,05
5	99,85	99,34	98,82
Média (%)	99,74	99,31	99,23
DPR (%)	0,49	0,76	0,45

Fonte: de autoria própria.

O doseamento do fenol pela cromatografia apresentou valores próximos aos teores obtidos através das metodologias já validadas, indicando o potencial do método proposto em fornecer resultados confiáveis. Os desvios padrões relativos também foram similares, demonstrando baixa variação em torno da média nos resultados. Porém, é importante assinalar que os métodos titulométrico e espectrofotométrico apresentam um número de etapas superior e mais suscetíveis à percepção humana do que o cromatográfico, como tempo de espera reacional e visualização de alterações de cores, possibilitando o aumento considerável do DPR por essas duas técnicas.

Apesar da aparente correspondência nos teores de fenol entre as três metodologias, foi realizado os testes F e T (Student) no *software* Microsoft Excel para verificar estatisticamente a equivalência entre as variâncias e as médias dos resultados. Os *p*-valores de cada teste são apresentados na Tabela 6 (página 60).

O *p*-valor do teste F avalia a probabilidade das variâncias de dois conjuntos de dados se sobreporem em uma distribuição normal. Todos os *p*-valores obtidos foram maiores que 0,05, aceitando-se a hipótese nula ( $H_0$ ) de que as variâncias são estatisticamente equivalentes para uma confiabilidade de 95%.

Tabela 6 – Resultados de teores de fenol

Métodos comparados	Teste	p-valor para aceitação de $H_0$	p-valor calculado
Cromatográfico e titulométrico	Teste F	$p > 0,05$	0,754
	Teste T ( <i>Student</i> )	$p > 0,05$	0,188
Cromatográfico e espectrofotométrico	Teste F	$p > 0,05$	0,406
	Teste T ( <i>Student</i> )	$p > 0,05$	0,319
Espectrofotométrico e titulométrico	Teste F	$p > 0,05$	0,260
	Teste T ( <i>Student</i> )	$p > 0,05$	0,961

Fonte: de autoria própria.

Já o  $p$ -valor do teste T verifica a probabilidade de dois conjuntos de dados se sobreporem em uma distribuição normal. Os resultados obtidos de  $p$ -valor acima de 0,05 indicam que as médias dos teores de fenol são estatisticamente equivalentes para um nível de confiança de 95%.

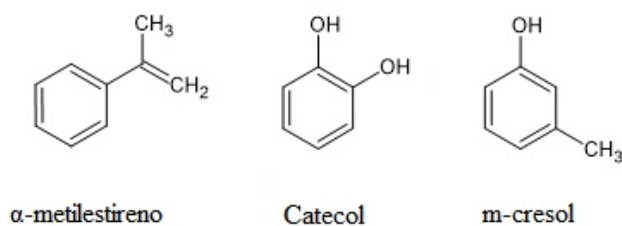
Pela lógica pressupõem-se que as três metodologias possuem equivalência estatística. Para ratificar essa informação, realizou-se também o teste Anova para avaliar, simultaneamente, os três conjuntos de dados. Obteve-se  $p$ -valor de 0,438, aceitando-se a hipótese nula de que os resultados possuem equivalência estatística entre si para 95% de confiança. A média geral foi de 99,46% de fenol e o DPR de 0,58%.

Respaldado pelos resultados apresentados, constata-se que o método cromatográfico proposto é capaz de fornecer sinal analítico de maneira seletiva para o analito fenol, sendo possível dar continuidade à avaliação dos demais parâmetros da validação.

## 4.2 SELETIVIDADE – PARTE II: QUANTIFICAÇÃO DE FENOL FRENTE À IMPUREZAS

Foram analisadas algumas amostras padrão de fenol contaminadas com as impurezas catecol, m-cresol e  $\alpha$ -metilestireno. Suas estruturas químicas são exibidas na Figura 18 (página 61).

Figura 18 – Estruturas químicas das impurezas  $\alpha$ -metilestireno, catecol e m-cresol. Estruturas feitas no software ChemSketch®.



Fonte: de autoria própria.

O fenol pode apresentar, ao fim da sua produção, outras impurezas, por exemplo a acetona, o cumeno, o isopropanol e a acetofenona, como foi apresentado no tópico de revisão bibliográfica sobre este analito. A escolha das substâncias indicadas na Figura 19 se deu pela similaridade estrutural em relação ao fenol, a disponibilidade do valor de compra e entrega dos reagentes em tempo hábil.

Os comportamentos observados dos métodos titulométrico e cromatográfico em relação ao doseamento de fenol na presença de impurezas estão descritos nos tópicos seguintes.

#### 4.2.1 Análises realizadas no método titulométrico

Foram analisadas triplicatas de amostras independentes de padrão de fenol contaminadas individualmente com as impurezas nas concentrações mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Percentagem mássica de impureza em cada amostra

Impureza	Percentagem mássica de impureza adicionada em cada replicata (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\alpha$ -metilestireno	1,63	1,70	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
m-cresol	0,00	0,00	0,00	2,05	1,82	1,83	0,00	0,00	0,00
catecol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,01	2,16	2,08

Fonte: de autoria própria.

A percentagem mássica de cada impureza nas replicatas variou devido ao preparo das amostras. Foram preparadas 9 soluções independentes de fenol com a adição de volumes iguais de solução estoque de impureza nas triplicatas de cada impureza. Os resultados de teores de fenol em cada uma das titulações são mostrados na Tabela 8 (página 62).

Tabela 8 – Teores de fenol (%) das amostras de titulação para comparação de método

	<b>Padrão de fenol puro</b>	<b>Fenol com <math>\alpha</math>-metilestireno</b>	<b>Fenol com m-cresol</b>	<b>Fenol com catecol</b>
	99,46	99,64	100,29	100,81
	98,71	100,22	100,90	101,48
	99,90	99,97	101,47	99,82
	99,41	-	-	-
	98,82	-	-	-
	99,05	-	-	-
Média	99,23	99,94	100,89	100,70
DPR	0,452	0,29	0,59	0,83

Fonte: de autoria própria.

Os valores de DPR demonstram baixa oscilação dos resultados são redor da média, sendo considerados satisfatórios. Os teores de fenol encontrados para as amostras contaminadas com m-cresol e catecol estão acima da faixa de especificação de 99,0 a 100,5% <sup>[4]</sup>. Era esperado que os valores de doseamento se mantivessem dentro da faixa apresentada, uma vez que a amostra foi preparada a partir de um padrão de fenol certificado.

Considerando o teor de fenol do padrão de 99,23% obtido pela análise titulométrica e comparando este resultado com os valores de 100,89 (fenol na presença de m-cresol) e 100,70% (fenol na presença de catecol), é perceptível um incremento do teor de fenol de 1,66 e 1,47% respectivamente.

Devido à similaridade da estrutura química das impurezas adicionadas em relação ao analito, investigou-se a possibilidade de as mesmas reagirem em concomitância ao fenol durante o seu doseamento. Isso explicaria o aumento dos teores na presença das impurezas.

No doseamento de fenol pela titulação de Kopperchaar, o analito reage com o bromo e o excesso deste interage com o iodeto formando o iodo. Este é reduzido pelo agente titulante até o ponto final da titulação e a quantificação de fenol se dá indiretamente. Ou seja, se no meio reacional houver outras substâncias que também possuem sítios ativos que podem reagir com o bromo, o teor de fenol calculado também irá considerar a reação o bromo consumido pela reação paralela.

A reação entre o bromo e o fenol ocorre por uma substituição eletrofílica aromática. O mecanismo geral dessa reação é mostrado na Figura 19 (página 63).

Figura 19 – Mecanismo geral da reação de substituição eletrofílica aromática.



Fonte: Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE (2012)

O bromo, na presença de um ácido de Lewis, como o ácido clorídrico, forma o eletrófilo  $\text{Br}^+$ . Este ataca o sistema  $\pi$  do anel formando um carbocátion não aromático, o íon arênio. O ânion derivado do eletrófilo remove um próton do carbono diretamente ligado ao bromo. O par de elétrons é então integrado ao sistema  $\pi$ , hibridizando o carbono novamente à  $\text{sp}^2$  e retornando à configuração inicial e mais estável do anel [85].

Diante do mecanismo apresentado, é nítido perceber que as impurezas analisadas também possuem sítios ativos que podem interagir com o bromo formando derivados substituídos. Dessa maneira, essas impurezas podem ser erroneamente quantificadas como fenol durante o doseamento da matéria-prima. Esse pressuposto é confirmado pela literatura, que apresenta estudos utilizando a titulação iodométrica de Kopperchaar para verificar o teor do m-cresol [86–88]. O catecol na presença de bromo em meio ácido também sofre bromação podendo formar 4,5-dibromocatecol ou 3,4,5-tribromocatecol [89].

Apesar do  $\alpha$ -metilestireno também apresentar sítio ativo passível de sofrer reação de bromação, não foram encontrados estudos que avaliaram a sua bromação em condições experimentais similares. Porém, devido ao incremento de 0,71% do teor de fenol na amostra contaminada com  $\alpha$ -metilestireno, é plausível sua bromação.

Torna-se evidente a interferência de substâncias de estrutura química similar ao fenol para sua quantificação através da titulação iodométrica de Kopperchaar, fornecendo resultados de teor do analito acima do que corresponde à realidade experimental.

#### 4.2.2 Análises realizadas no método cromatográfico

Analisou-se cinco amostras independentes de padrão de fenol puro e contaminadas com as impurezas nas concentrações mostradas na Tabela 9 (página 64).

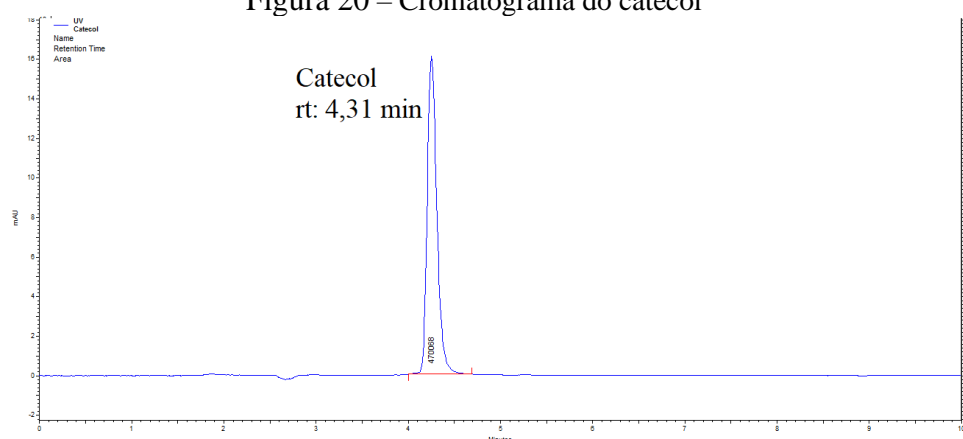
Tabela 9 – Percentagem mássica de impureza nas amostras para cromatografia

Replicata	Impureza adicionada (%)		
	Individual (%)		Total (%)
1	$\alpha$ -metilestireno	0,96	2,93
	m-cresol	0,95	
	catecol	1,03	
2	$\alpha$ -metilestireno	0,85	2,61
	m-cresol	0,84	
	catecol	0,91	
3	$\alpha$ -metilestireno	0,86	2,62
	m-cresol	0,85	
	catecol	0,92	
4	$\alpha$ -metilestireno	0,86	2,64
	m-cresol	0,85	
	catecol	0,92	
5	$\alpha$ -metilestireno	0,90	2,75
	m-cresol	0,89	
	catecol	0,97	

Fonte: de autoria própria.

Devido ao fato de o método cromatográfico ser baseado na separação de compostos, as amostras foram preparadas com soluções combinadas das impurezas, visto a capacidade de separação dos picos da técnica. Os cromatogramas individuais e com fenol são apresentados nas Figuras 20, 21 (página 65) e 22 (página 65).

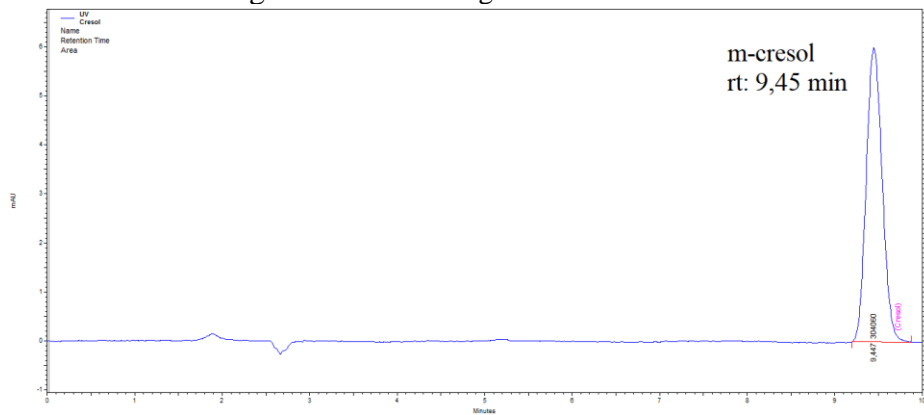
Figura 20 – Cromatograma do catecol



Fonte: de autoria própria.

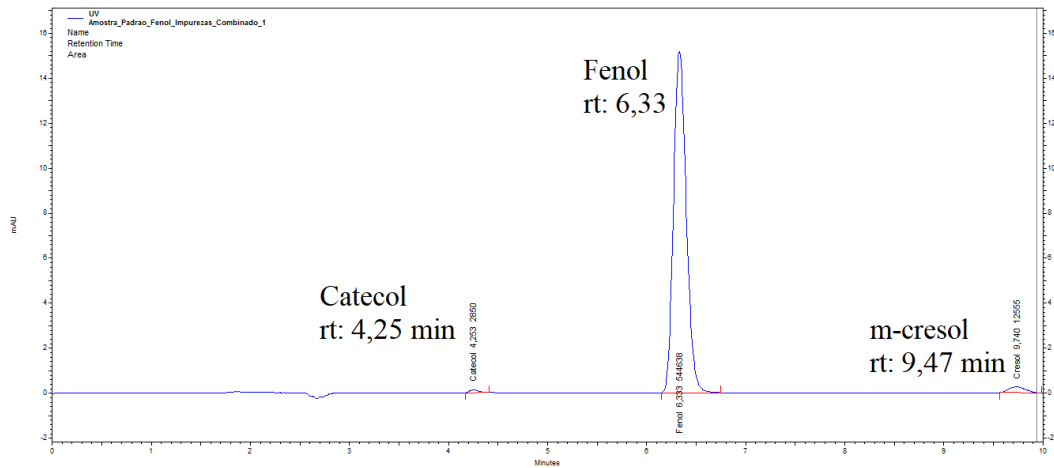


Figura 21 – Cromatograma do m-cresol



Fonte: de autoria própria.

Figura 22 – Cromatograma da amostra de fenol contaminado com impureza combinada



Fonte: de autoria própria.

O catecol e m-cresol foram detectados com uma boa resolução em relação ao pico de fenol, evidenciando a separação dessas substâncias. Já o  $\alpha$ -metilestireno não foi detectado nas condições experimentais testadas. Foi realizado um teste com tempo de corrida três vezes maior, contudo não foi promissor para identificar seu tempo de retenção.

Analisou-se, primeiramente, o tempo de retenção referente ao pico do fenol. Os valores estão expostos na Tabela 10 (página 66).

Tabela 10 – Tempo de retenção do fenol

Replicata	Amostra de padrão de fenol puro	Amostra de padrão de fenol contaminado com impureza
1	6,313	6,304
2	6,333	6,320
3	6,126	6,327
4	6,207	6,333
5	6,233	6,327

Fonte: de autoria própria.

Como é observado, o tempo de retenção de fenol apresentou pouca divergência entre as amostras de padrão puro em relação às amostras contaminadas com impureza combinada. Pelo teste T (*Student*), calculou-se um *p*-valor de 0,100, indicando que as médias são estatisticamente equivalentes para uma confiabilidade de 95%.

Os resultados de teores de fenol obtidos em cada uma das amostras são mostrados na Tabela 18.

Tabela 11 – Teores de fenol para as amostras de padrão e padrão contaminado

Replicata	Teores de fenol (%)		
	Padrão de fenol puro	Fenol contaminado considerando apenas a massa de fenol	Fenol contaminado considerando a massa de fenol + impurezas
1	99,62	97,41	94,55
2	99,26	95,42	92,93
3	99,21	96,34	93,81
4	<b>95,67</b>	94,16	91,68
5	99,21	89,51	87,04
MÉDIA (%)	99,33	94,57	92,00
DPR (%)	0,20	3,25	3,23

Fonte: de autoria própria.

O valor de 95,67% para o teor de fenol da replicata 4 de padrão puro foi considerado *outlier* pelo teste de Grubbs e eliminado do grupo de dados para análise estatística e cálculo da média.

A terceira coluna da Tabela 11 mostra os teores de fenol calculados considerando apenas a massa de fenol. Era esperado que os resultados fossem equivalentes aos teores de fenol pela análise das amostras de padrão puro, ou seja, que a recuperação do analito fosse de próximo à 100%, o que não se sucedeu. A diferença entre as médias foi de 4,76% a menos de fenol nas

amostras contaminadas. No teste T, o  $p$ -valor calculado foi de 0,026, evidenciando a divergência entre os teores para um nível de confiança de 95%.

A quarta coluna da Tabela 11 exibe os teores de fenol calculados considerando as massas de fenol e de cada impureza adicionada, considerando a percentagem de cada uma delas descritas na Tabela 16. Esperava-se dois comportamentos em relações a esses resultados. O primeiro deles é de que o teor de fenol diminuísse, ou seja, o método proposto é capaz de oferecer um sinal analítico menor na presença de possíveis impurezas, tal como ocorreu.

A segunda indagação era de que os teores de fenol de cada replicata somados ao percentual de impurezas adicionadas resultasse em valores equivalentes aos teores de fenol obtidos pela análise das amostras de padrão puro. Porém, os cálculos fornecem valores anômalos, como é mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Soma dos teores de fenol e percentuais de impureza adicionada em cada replicata de amostra analisada

<b>Replicata</b>	<b>Teor de fenol (%)</b>	<b>Impureza adicionada (%)</b>	<b>Soma (%)</b>
1	94,55	2,93	97,48
2	92,93	2,61	95,54
3	93,81	2,62	96,43
4	91,68	2,64	94,32
5	87,04	2,75	89,79
<b>MÉDIA</b>	<b>92,00</b>	<b>2,71</b>	<b>94,71</b>

Fonte: de autoria própria.

Os valores referentes à quarta coluna da Tabela 19 deveriam ser equivalentes aos teores de fenol de padrão, porém a diferença entre as médias desses grupos foi 4,62% a menos de fenol nas amostras contaminadas.

Há duas possíveis causas que justificam a diminuição do teor de fenol na presença de impurezas. Devido à similaridade de suas estruturas, existe a possibilidade de a interação entre as mesmas ocasionar em um carreamento simultâneo. Ou seja, uma pequena quantidade de moléculas de fenol que interagiram com a impureza catecol são identificadas como catecol. Da mesma maneira, uma pequena quantidade de moléculas das impurezas poderia ser transportada junto com o fenol. Esse tipo de interação pode ocorrer, ainda que os cromatogramas apresentem picos que visualmente não coeluem. Como consequência, a pureza dos picos decairia. A segunda possível causa para a diminuição do teor de fenol nas amostras de impureza combinada é a ocorrência de reações paralelas.

A fim de avaliar as hipóteses levantadas, foram analisadas amostras de padrão de fenol contaminadas em diferentes concentrações de impurezas, entre a faixa de 0,10% a 0,90%. Essa faixa corresponde ao limite de resíduos não voláteis aceitos pela Farmacopeia Brasileira para a matéria-prima fenol <sup>[4]</sup>, de 0,05%, e o valor máximo de impureza aceito pelo mesmo compêndio para a matéria-prima fenol. Os resultados de teor de fenol e pureza do pico para cada solução analisada estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13- Teores de fenol e pureza de pico para soluções contaminadas de 0,10% a 0,90%

<b>Replicata</b>	<b>Teor de impureza (%)</b>	<b>Teor de fenol (%)</b>	<b>Pureza do pico (%)</b>
1	0,10%	99,03	100,00%
2	0,30%	100,62	100,00%
3	0,50%	99,91	100,00%
4	0,70%	100,08	100,00%
5	0,90%	100,73	100,00%
<b>MÉDIA</b>	-	100,07	100,00%

Fonte: autoria própria

Foi obtido uma média de 100,07% de teor de fenol. Esse valor está mais coerente com os resultados de doseamento para o padrão. Quando se avalia esse conjunto de dados, pelo Teste T, com os teores de fenol obtidos na Seletividade – Parte I (Tabela 5, página 55), obtêm-se um *p*-valor de 0,394, indicando que os resultados são estatisticamente equivalentes para um nível de confiança de 95%.

Em relação à pureza do pico, é observado as impurezas não interferiram na coeluição dos picos por carreamento simultâneo entre as mesmas e o analito na faixa de concentração analisada de 0,10 a 0,90%.

Diante dos novos resultados, foram analisadas 6 amostras de soluções independentes de fenol contaminadas com impureza combinada na concentração de 1,00%, o limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira para a matéria-prima fenol <sup>[4]</sup>. Os resultados de teor de fenol e pureza do pico para cada solução analisada estão descritos nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Teores de fenol e pureza de pico para soluções de padrão de fenol puro

<b>Amostra</b>	<b>Replicata</b>	<b>Teor de fenol (%)</b>	<b>Pureza do pico (%)</b>
<b>Soluções independentes de fenol puro</b>	1	98,78	99,99
	2	98,63	100,00
	3	99,69	100,00
	4	99,65	100,00
	5	102,82	100,00
	6	99,82	99,99

Fonte: autoria própria

Tabela 15 - Teores de fenol e pureza de pico para soluções contaminadas a 1,00%

<b>Amostra</b>	<b>Replicata</b>	<b>Teor de fenol (%)</b>	<b>Pureza do pico (%)</b>
<b>Soluções independentes de fenol contaminado com impureza</b>	1	99,27	100,00
	2	99,17	99,99
	3	99,51	99,99
	4	101,71	100,00
	5	95,10	99,99
	6	101,53	99,99

Fonte: autoria própria

Como pode ser observado nas tabelas anteriores, os teores de fenol quanto os valores de pureza de pico para as soluções de padrão de fenol puro e contaminadas apresentam similaridades visíveis.

Comparando-se, através do Teste T, os conjuntos de dados de teores de fenol dos dois tipos de amostras, obtêm-se *p*-valor de 0,663, evidenciando a correspondência estatística entre as médias dos valores de quantificação de fenol para um nível de confiança de 95%. Comparando-se, da mesma maneira, a pureza do pico, obtêm-se um *p*-valor de 0,749.

A Farmacopeia Brasileira estabelece um limite inferior de teor de fenol para a matéria-prima de 99,0%. Avaliando-se soluções independentes de fenol contaminadas com impureza a 1,00%, foi possível constatar que a presença de impurezas, nas condições analisadas, não interfere na quantificação do fenol. Os resultados de doseamento foram estatisticamente equivalentes às soluções de padrão puro e a pureza do pico do analito se manteve acima de 99,99%, tanto nas soluções de concentração de 0,10 à 0,90%, quanto nas amostras de 1,00% de impureza.

Diante dos resultados apresentados para a avaliação da quantificação de fenol frente às impurezas, é coerente afirmar que o método cromatográfico proposto é capaz de fornecer sinal analítico seletivo do fenol na presença das impurezas catecol, m-cresol e  $\alpha$ -metilestireno nas condições cromatográficas apresentadas.

### 4.3 LINEARIDADE

A avaliação da linearidade verifica a adequabilidade do método analítico proposto ao modelo linear simples, ou seja, se os sinais fornecidos pelo detector do HPLC são diretamente proporcionais à concentração do fenol dentro da faixa de trabalho estabelecida.

Foram analisadas, aleatoriamente, três curvas de calibração independentes com os cinco níveis de concentração (5, 6, 7, 8 e 9 mg L<sup>-1</sup>) de maneira combinada. As respectivas concentrações teóricas e área obtidas de cada solução são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16– Curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade

Nível / Replicata	Concentração teórica (mg L <sup>-1</sup> )	Área
1 replicata 1	5,71	413344
1 replicata 2	5,37	376116
1 replicata 3	5,18	361949
2 replicata 1	6,85	478567
2 replicata 2	6,44	412418
2 replicata 3	6,22	439206
3 replicata 1	7,99	590158
3 replicata 2	7,52	524158
3 replicata 3	7,26	511835
4 replicata 1	9,13	650576
4 replicata 2	8,59	608856
4 replicata 3	8,29	591222
5 replicata 1	10,27	753953
5 replicata 2	9,67	675534
5 replicata 3	9,33	658256

Fonte: de autoria própria.

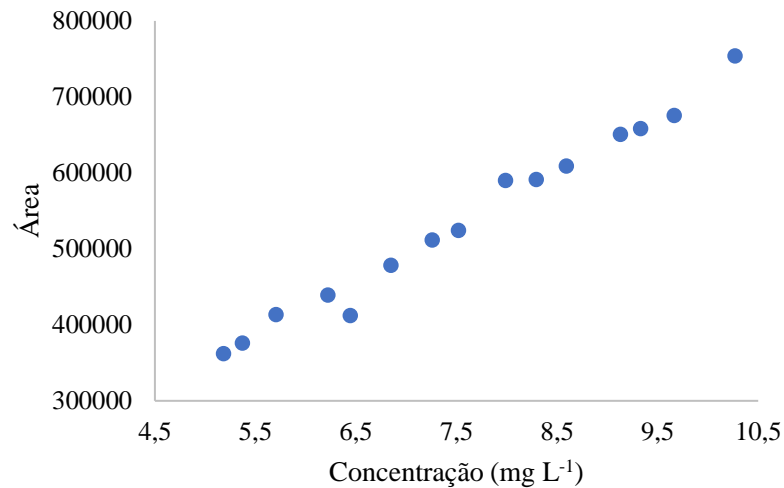
Os valores obtidos de área para cada nível e concentração teórica de fenol exibem, em quase a totalidade dos dados, correlação lógica de grandeza. A partir dos dados da Tabela 7, elaborou-se um gráfico com a curva analítica combinada das três curvas individuais analisadas. O gráfico está apresentado na Figura 23 (página 71).

A análise visual do gráfico não apresenta caráter comprobatório, porém é recomendado utilizar a mesma como avaliação inicial para verificar a possível adequabilidade do método analítico ao modelo matemático proposto. Como pode ser observado no gráfico da Figura 23 (página 71), apesar da presença de pontos que indicam a possibilidade da presença de *outliers*, percebe-se um comportamento linear crescente, sendo um indicativo de que a resposta analítica se encaixa no modelo linear.

A análise visual do gráfico não apresenta caráter comprobatório, porém é recomendado utilizar a mesma como avaliação inicial para verificar a possível adequabilidade do método analítico ao modelo matemático proposto. Como pode ser observado no gráfico da Figura 23 (página 71), apesar da presença de pontos que indicam a possibilidade da presença de *outliers*,

percebe-se um comportamento linear crescente, sendo um indicativo de que a resposta analítica se encaixa no modelo linear.

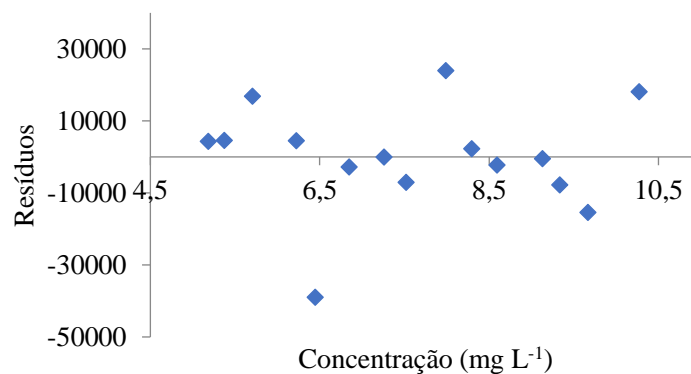
Figura 23 – Curva de calibração obtida para o teste de linearidade



Fonte: gráfico gerado pelo *software* Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Outra análise visual gráfica importante é a elaboração do gráfico de resíduos, que mostra a diferença entre as áreas previstas pela curva de calibração e as áreas obtidas no cromatograma. Utilizou-se os dados das três curvas de calibração para realizar essa avaliação. O gráfico é mostrado na Figura 24.

Figura 24 – Resíduos da regressão linear da curva de calibração da linearidade



Fonte: gráfico gerado pelo *software* Microsoft Excel<sup>®</sup>.

No gráfico apresentado na figura anterior, verifica-se a distribuição uniforme e aleatória dos resíduos ao longo da faixa de concentração do analito. Essa análise indica que não há uma

tendência visualmente perceptível entre os valores da abscissa e os resíduos, demonstrando que os resíduos são aleatórios.

A avaliação visual dos resíduos foi corroborada pelo teste de Durbin-Watson, que avalia a autocorrelação dos resíduos. Obteve-se um  $p$ -valor de 0,3952, aprovando a hipótese nula de que as variações observadas nos dados não são correlacionadas, em um nível de significância de 95%.

Analisou-se também a presença de *outliers* e normalidade dos dados da Tabela 16 (página 70). No teste de resíduos padronizados de Jackknife, foi identificado o *outlier* da replicata 2 do nível 2, correspondente à concentração de 6,44 mg L<sup>-1</sup> e à área de 412418. Apesar da presença do mesmo, a avaliação da normalidade dos dados, pelo teste de Shapiro-Wilk, e autocorrelação dos resíduos, foram satisfatórios. O  $p$ -valor do teste de Shapiro-Wilk foi de 0,1576, demonstrando que os dados estão dentro da distribuição normal com confiabilidade de 95%. Dessa maneira, o *outlier* encontrado pelo teste de Jackknife pode ser mantido no conjunto de dados, uma vez que não interferiu nas características de normalidades e autocorrelação desejadas [55].

Outro teste de análise residual realizado foi o de Brown-Forsythe para avaliação da homocedasticidade dos dados. Obteve-se um  $p$ -valor de 0,7699 aceitando-se a hipótese nula de que os dados são homocedásticos.

Os dados da curva combinada de linearidade foram avaliados pelo teste Anova a fim de verificar se o modelo linear se ajusta ao método. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros avaliados no teste Anova para linearidade

Teste	Critério de aceitação	Resultado
Anova (avaliação da regressão)	$> 2,40$ <sup>1</sup>	842,19
Anova (desvio de linearidade)	$< 2,40$ <sup>1</sup>	$3,32 \times 10^{-13}$
Coeficiente de correlação	$r > 0,990$	0,9920
Coeficiente de determinação	$r^2 \geq 0,980$	0,9848

<sup>1</sup> F<sub>crítico</sub> tabelado para um nível de confiança de 95%.

Fonte: de autoria própria.

Para a avaliação da regressão considerou-se como hipótese nula de que não existe relação linear entre as variáveis área e concentração de fenol e o modelo linear simples não é adequado ao método proposto. A H<sub>0</sub> é rejeitada para F<sub>calculado</sub> > F<sub>crítico</sub>, como o valor de F obtido foi de 842,19 rejeita-se a H<sub>0</sub> em favor da H<sub>1</sub> de que a relação linear entre as variáveis são válidas e



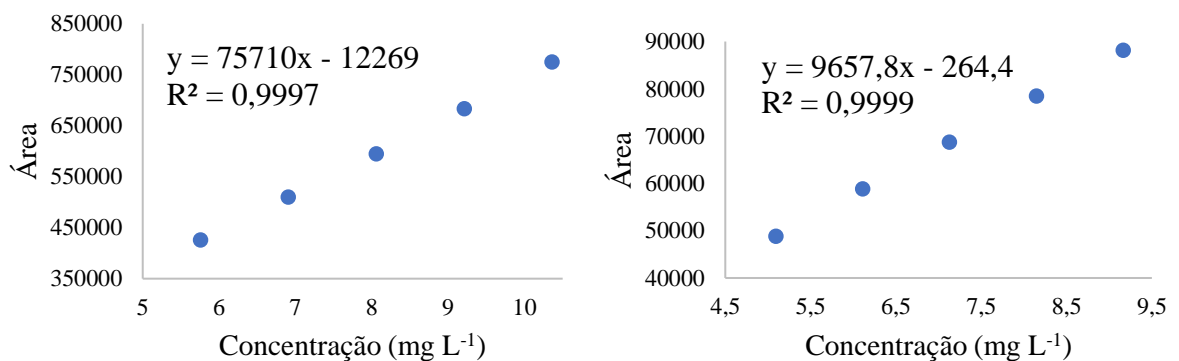
lineares para 95% de confiabilidade. O desvio de linearidade também foi avaliado com o valor de  $F_{\text{calculado}}$ , sendo este obtido de  $3,32 \times 10^{-13}$ . Como  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$  aceita-se a hipótese nula de que não há desvio de linearidade para o nível de significância avaliado. Em relação aos coeficientes de correlação e de determinação foram encontrados os valores de 0,9920 e 0,9848, respectivamente. Os mesmos atendem aos requisitos atualmente preconizados, por isso foram considerados satisfatórios.

Com base nas informações apresentadas, é possível assegurar que o modelo de regressão linear simples se adequa à metodologia de doseamento da matéria-prima fenol nas condições experimentais avaliadas.

#### 4.4 PRECISÃO E EXATIDÃO

A avaliação da precisão e da exatidão ocorreu em condições de precisão intermediária com a análise de sextuplicatas de amostras independentes de padrão de fenol nas concentrações de 5, 7 e 9 mg L<sup>-1</sup>, correspondentes aos níveis 1, 3 e 5, respectivamente. A análise foi realizada por dois dias diferentes com analistas e cromatógrafos distintos. As duas curvas de calibração obtidas pelos experimentos 1 e 2 são mostradas na Figura 25.

Figura 25 – Curvas de calibração utilizadas para a avaliação da precisão e da exatidão



(a) Curva de calibração do experimento 1

(b) Curva de calibração do experimento 2

Fonte: gráficos gerados pelo *software* Microsoft Excel<sup>®</sup>.

A aprovação anterior dos parâmetros avaliados na linearidade permite utilizar o coeficiente de determinação para assegurar a confiabilidade das curvas. Como observado na Figura 25, os coeficientes de determinação de ambas as equações foram maiores que 0,999, se adequando o valor requerido (maior ou igual a 0,980). As curvas de calibração foram utilizadas, então, para calcular os teores de fenol dos experimentos 1 e 2 e seus respectivos valores de recuperação. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados dos experimentos 1 e 2 para avaliação da precisão e exatidão

Nível/ Replicata	Experimento 1				Experimento 2			
	Conc. teórica (mg L <sup>-1</sup> )	Área	Conc. real (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Conc. teórica (mg L <sup>-1</sup> )	Área	Conc. real (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
1.1	5,25	377579	5,15	98,18	5,10	48743	5,03	98,68
1.2	4,70	346305	4,74	100,88	4,83	46173	4,76	98,61
1.3	4,83	358918	4,91	101,53	5,39	52143	5,38	99,86
1.4	5,65	421096	5,73	101,38	5,28	51301	5,29	100,17
1.5	5,96	438681	5,96	100,08	5,65	54492	5,62	99,46
1.6	4,77	351888	4,81	100,98	5,12	50087	5,17	100,98
3.1	7,35	550273	7,44	101,20	7,13	68508	7,06	98,91
3.2	6,58	482356	6,54	99,40	6,77	64924	6,69	98,88
3.3	6,77	497278	6,74	99,55	7,54	72625	7,48	99,20
3.4	7,91	591474	7,98	100,88	7,40	71581	7,37	99,69
3.5	8,34	620110	8,36	100,24	7,91	76368	7,86	99,42
3.6	6,67	495196	6,71	100,52	7,16	70118	7,22	100,82
5.1	9,45	695317	9,36	99,00	9,17	88361	9,09	99,14
5.2	8,46	633091	8,53	100,87	8,70	83391	8,58	98,69
5.3	8,70	650654	8,76	100,74	9,69	93741	9,65	99,51
5.4	10,17	747593	10,05	98,75	9,51	92379	9,51	99,98
5.5	10,72	796058	10,69	99,66	10,17	98137	10,10	99,29
5.6	8,58	632968	8,53	99,41	9,21	90343	9,30	100,95

Fonte: de autoria própria.

Apesar da avaliação da precisão e exatidão utilizar os valores de recuperação dos dois conjuntos de dados como procedentes do mesmo grupo amostral, é possível observar que as informações apresentadas na Tabela 9 não indicam a presença de *outliers* ou resultados fora do intervalo de interesse (entre 80 a 110%). O teste de resíduos padronizados de Jackknife confirmou a ausência de dados discrepantes.

Analisou-se também a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a autocorrelação (teste de Durbin-Watson) dos resíduos. Os resultados dos testes estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados dos testes estatísticos para avaliação da precisão e exatidão

Teste	Critério de aceitação	Análise	Resultado
Shapiro-Wilk	$p$ -valor >0,05	Experimento 1	0,5384
		Experimento 2	0,1341
Durbin-Watson	$p$ -valor >0,05	Experimento 1	0,4434
		Experimento 2	0,2863

Fonte: de autoria própria.

Os  $p$ -valores obtidos foram acima de 0,05, indicando que as variações são independentes e os dados seguem a distribuição normal para um nível de confiança de 95%. Considerou-se, então, as informações da Tabela 9 como satisfatórias para realizar a avaliação da precisão e exatidão do método.

Utilizou-se os resultados por nível dos dois experimentos para calcular os valores de DPR e recuperação geral por nível (conjunto de 12 dados/nível). Os resultados estão expostos na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados de DPR e recuperação para avaliação de precisão e exatidão

Nível	DPR Experimento 1 (%)	DPR Experimento 2 (%)	DPR geral (%)	Média de recuperação (%)
1	1,24	0,91	1,14	100,07
2	0,71	0,73	0,81	99,89
3	0,89	0,79	0,81	99,67

Fonte: de autoria própria.

Os valores de DPR por experimento para os três níveis de concentração apresentam similaridades, indicando a robustez do método em manter dispersões dos resultados semelhantes apesar da variação de analista, marca e modelo de cromatógrafo e dia de análise. Assim como os valores de DPR por experimento-nível, os dados de DPR geral também apresentaram resultados adequados, abaixo de 7,3%. As médias de recuperação por nível variaram entre 99,67 a 100,07%. Estes se encontram dentro da faixa esperada de 80,0 a 110,0%<sup>[55]</sup> para as concentrações de fenol analisadas.

Considerando os resultados expostos, verifica-se que o método cromatográfico proposto é capaz de fornecer um sinal analítico preciso e exato para a quantificação do analito fenol.

#### 4.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O cálculo para determinação dos limites de detecção e quantificação foi realizado conforme as 5 (página 28) e 6 (página 29), respectivamente, utilizando o coeficiente angular da curva de calibração obtida na avaliação da linearidade e o desvio padrão entre os dados do nível 1 da mesma curva. Os resultados de LD e LQ são mostrados na Tabela 21 (página 76).

Tabela 21 – Resultados dos limites de quantificação e detecção teóricos

Limite	Equação utilizada	Desvio padrão	Coefficiente angular	Resultado (mg L <sup>-1</sup> )
Detecção	$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$	26545,79	74347	1,18
Quantificação	$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$			3,57

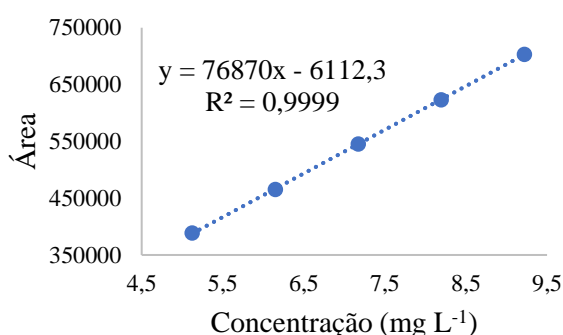
Fonte: de autoria própria.

Os valores teóricos de LD e LQ, 1,18 e 3,57 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, foram considerados elevados quando comparados a limites encontrados na literatura de 0,38 para detecção e 1,11 mg L<sup>-1</sup> para quantificação [79].

A validação do método proposto neste trabalho tem por objetivo o doseamento da matéria-prima fenol. Na rotina laboratorial é incomum o recebimento deste reagente em baixas concentrações, tornando o cálculo teórico para determinação do LD suficiente para a aplicação na qual se propõe o trabalho.

No limite de quantificação foi verificado a concentração aproximada de 3,57 mg L<sup>-1</sup> e testado a concentração de 2,00 mg L<sup>-1</sup>. Foram analisadas as recuperações e valores de DPR de 6 amostras independentes nas duas concentrações a partir da interpolação da curva analítica da Figura 26.

Figura 26 – Curva de calibração utilizada para avaliação do limite de quantificação



Fonte: gráfico gerado pelo *software* Microsoft Excel<sup>®</sup>.

No teste de Shapiro-Wilk o *p*-valor calculado foi de 0,4757. Já no teste de Durbin-Watson o *p*-valor encontrado foi de 0,6816. Tais valores de probabilidade aprovam a hipótese nula de que a curva apresenta dados normais e resíduos não correlacionado em um nível de confiança de 95%. Além disso o coeficiente de determinação também indica a adequabilidade da curva de calibração ( $r^2 \geq 0,98$ ).

Utilizou-se, então, a curva de calibração para calcular os teores de fenol para verificação do LQ e seus respectivos valores de recuperação. Os resultados são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados das amostras de limite de quantificação

LQ testado	Replicata	Conc. teórica (mg L <sup>-1</sup> )	Área	Conc. real (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
2 mg L <sup>-1</sup>	1	1,97	151404	2,03	103,21
	2	2,11	162339	2,17	102,81
	3	1,95	150338	2,02	103,27
	4	2,05	156932	2,10	102,59
	5	2,21	167412	2,24	101,18
	6	2,15	165221	2,21	102,62
	7	2,13	169259	2,26	106,24
3,5 mg L <sup>-1</sup>	1	3,54	342343	<b>4,49</b>	<b>126,85</b>
	2	3,80	286621	3,77	99,26
	3	3,52	338506	<b>4,44</b>	<b>126,38</b>
	4	3,69	279406	3,68	99,80
	5	3,98	299857	3,94	99,11
	6	3,87	294386	3,87	99,99
	7	3,83	291089	3,83	100,02

Fonte: de autoria própria.

Na Tabela 13 é possível visualizar dois dados destacados que foram identificados como *outliers* pelo teste de Grubbs e excluídos para as etapas posteriores.

A análise de normalidade e autocorrelação dos resíduos apresentou resultados satisfatórios para um nível de confiança de 95%. Foram obtidos *p*-valores de 0,1203 e 0,2955 para as concentrações de 2,0 e 3,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, no teste de Shapiro-Wilk. Na avaliação de Durbin-Watson os *p*-valores foram 0,5658 e 0,8828 para 2,0 e 3,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os valores de recuperação variaram entre 101,18 a 103,27% na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> e 99,80 a 100,02% em 3,5 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados compreendem a faixa de 80,0 a 110,0% [55] para as concentrações de fenol analisadas no método, sendo considerado apropriado.

Já os valores de DPR calculados foram de 0,74% e 0,43% para as concentrações de 2,0 e 3,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Resultados estes abaixo do valor recomendado de 7,3% [55], sendo avaliados como satisfatórios.

Fundamentado pelas informações expostas, assegura-se que o limite de detecção do método proposto é de 1,18 mg L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação, verificado experimental e estatisticamente, é de 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Tais resultados são considerados adequados para a aplicabilidade das rotinas laboratoriais para doseamento da matéria-prima fenol.

#### 4.6 COMPARAÇÃO DE MÉTODO

Na validação analítica são avaliadas as figuras de mérito a fim de observar se o comportamento do método proposto atende às expectativas de desempenho quando o mesmo é submetido à algumas nuances. Porém, a substituição de um método validado e já familiar em uma rotina laboratorial por uma nova metodologia deve ser acompanhada de uma análise crítica de outros atributos.

Considerando, primeiramente, os aspectos relacionados aos reagentes químicos utilizados em cada um dos métodos, nota-se uma diferença considerável entre os dois métodos. O método titulométrico utiliza alguns reagentes tóxicos, como o bromo, o iodo e o clorofórmio. O bromo molecular é irritante para as mucosas e as vias respiratórias, sendo letal por inalação. Em contato com a pele e os olhos pode causar lesões e queimaduras profundas [81]. Já o iodo molecular é nocivo para a pele, o aparelho respiratório e os olhos, podendo causar reações alérgicas como cefaleia, erupção cutânea e irritação das mucosas [38]. O clorofórmio também é tóxico para o ser humano, causando irritações das mucosas com vômitos e diarreia, queimaduras na pele e arritmia cardíaca [82].

Já o método cromatográfico utiliza apenas o padrão de fenol, metanol grau HPLC e água ultrapurificada. O metanol pode causar náuseas, vômitos, dores de cabeça e fraqueza [83]. No método proposto o contato do analista com esse reagente é apenas na transferência do frasco original para os reservatórios de solvente do HPLC. Sendo assim, os riscos associados ao metanol são mínimos.

O fenol também apresenta efeitos adversos à saúde humana, como fadiga, mal-estar e náuseas quando inalado ou em contato cutâneo [24]. Porém, pelo fato de o fenol já ser o analito em questão a ser submetido ao doseamento, seus riscos são intrínsecos à sua própria análise, independentemente do método em questão.

A quantidade e toxicidade dos reagentes utilizados em cada método também se relaciona à geração de resíduos com maior complexidade de tratamento. Na titulação iodométrica de Kopperchaar, considerando as soluções volumétricas já padronizadas, são utilizados 8

reagentes diferentes: brometo de potássio, bromato de potássio, tiosulfato de sódio, carbonato de sódio, ácido clorídrico, iodeto de potássio, clorofórmio e amido. Em contrapartida, o resíduo gerado pelo método cromatográfico é uma solução em metanol e água de fenol em concentração de partes por milhão. Além disso, a diversidade de reagentes e consequente heterogeneidade dos resíduos caminha em contra mão aos princípios da Química Verde de prevenção e de uso de solventes e auxiliares mais seguros <sup>[84]</sup>.

Em relação aos custos, o método titulométrico apresenta a vantagem de não necessitar de equipamento específico, diminuindo seu consumo financeiro de implementação e uso. Já na cromatografia líquida, é fundamental a aquisição de um cromatógrafo, a inclusão de um analista qualificado para operar o equipamento e as manutenções preventivas e qualificações do mesmo, elevando o custo da análise. Apesar do maior valor agregado do método cromatográfico, a automação da instrumental permite diminuir a carga hora-trabalhador, sobretudo em situações de grande número amostral.

No que se refere a fonte de erros, a titulação e a cromatografia possuem algumas possibilidades de equívocos em comum, como perda da massa de fenol durante sua transferência, aferição do menisco e pipetar erroneamente o volume da solução. Porém, o método titulométrico ainda apresenta mais etapas que podem ocasionar na determinação errônea do teor de fenol. Algumas dessas etapas são perda do ponto final, decomposição do indicador amido devido sua adição no início da titulação e baixa agitação do Erlenmeyer durante a adição do agente titulante.

#### **4.7 ANÁLISE DE AMOSTRA CONTROLE**

Durante o processo de validação, uma matéria-prima de fenol de teor desconhecido para o analista foi analisada em dias diferentes. O doseamento foi realizado pelos métodos titulométrico e cromatográfico e os resultados foram de 99,77 e 99,49%, respectivamente. Avaliando estatisticamente, todos os dados dos conjuntos amostrais, foi calculado pelo Teste T (*Student*) um *p*-valor de 0,748 para um nível de confiabilidade de 95%, indicando a equivalência estatística da média dos dados.

Essa mesma amostra já havia sido aprovada anteriormente pelo do Serviço de Controle Físico-Químico da Funed. O resultado emitido pelo laboratório foi de 99,9% de fenol. Foi realizado, então, o teste Anova para avaliar, simultaneamente, os três conjuntos de dados. Obteve-se *p*-valor de 0,9592, aceitando-se a hipótese nula de que os resultados possuem equivalência estatística entre si para 95% de confiança.

## 5 CONCLUSÃO

No desenvolvimento do presente trabalho empregou-se de forma direta conhecimentos fundamentais e específicos relacionados à formação do Químico Tecnológico Bacharel: técnicas básicas laboratoriais, planejamento experimental, análise por via úmida (titulação iodométrica), operação de equipamentos instrumentais (cromatógrafos e espectrofotômetro), validação analítica, investigação de resultados anômalos e tratamento estatístico de dados. Todas essas ferramentas possibilitaram a avaliação de figuras de mérito preconizados pela Anvisa através da RDC n° 166/2017 para o método de quantificação da matéria-prima fenol em substituição à metodologia farmacopeia por titulação iodométrica de Kopperchaar.

O método cromatográfico apresentou uma resposta satisfatória com a quantificação de fenol estatisticamente equivalente aos métodos espectrofotométrico e titulométrico.

A avaliação da presença das impurezas  $\alpha$ -metilestireno, m-cresol e catecol na quantificação do fenol no método titulométrico indicaram que as mesmas interferem nos resultados analíticos. Houve um incremento do valor do teor de fenol nas amostras contaminadas com impureza devido, provavelmente, às reações de bromação por substituição eletrofílica aromática que também ocorrem com as impurezas. Já no método cromatográfico, os resultados obtidos foram estatisticamente equivalentes comparando-se amostras de solução padrão de fenol puro e contaminadas com as impurezas no limite de concentração de até 1,00%. Indicando que o método proposto produz sinal analítico seletivo.

O sinal analítico fornecido pelo detector UV/VIS do HPLC se mostrou diretamente proporcional às concentrações de fenol da faixa de trabalho de 5,0 a 9,0 mg L<sup>-1</sup>, atestando a adequabilidade do método proposto ao modelo linear simples.

A análise de precisão e exatidão também se mostrou satisfatória, visto que os valores de recuperação (entre 99,67 a 100,07%) e desvio padrão relativo (máximo de 1,41%) obtidos se encontram dentro do intervalo esperado de 80,0 a 110,0% para recuperação e 7,3 a 11% de DPR. Teoricamente o método é sensível para detectar fenol em concentrações acima de 1,18 mg L<sup>-1</sup>. Já o limite de quantificação foi testado para uma concentração mínima de 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Em relação ao método titulométrico, a metodologia de doseamento de fenol proposta neste trabalho apresenta vantagens: menor quantidade de reagentes, uso de reagentes com menor toxicidade ao analista, automatização de parte da análise, inserção a princípios da Química Verde e menor quantidade de etapas de análise.



## **5.1 PROPOSTA DE CONTINUIDADE**

Diante dos resultados e conclusões apresentadas, compreende-se a validação completa do método cromatográfica para quantificação da matéria-prima fenol. Como proposta de continuidade, será elaborada uma nota técnica à Anvisa sugerindo a implementação do método proposto como método farmacopeico alternativo à titulação iodométrica de Kopperchaar.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TODESCHINI, V., NUNES, I. S., Sangoi, M. S., Teixeira, F. M., JUNIOR, A. M., Machado, C., Costa, C. B. P., Teixeira, M. G. C. da S., & Fegueredo, R. C. (2021). *APRIMORAMENTO SOCIAL E PROFISSIONAL ENVOLVENDO ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS E AS BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES*. Fundação Centro Estadual de Estatística, Pesquisas e Formação de Servidores Públicos do Rio de Janeiro.
2. Acidentes por Animais Peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informações de Agravos de Notificação - Sinan net. , Ministério da Saúde (2022).
3. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. (2001). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos* (2nd ed.). Ministério da Saúde.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (2019). *Farmacopeia Brasileira: Monografias – Produtos Biológicos. Vol. 1*.
5. INSTITUTO BUTANTAN. (2018). *Soros e Vacinas do Butantan*.
6. FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. (2022). *Fazenda Experimental São Judas Tadeu e Produção de Soros: produção de soros heterólogos e hiperimunes da Funed*. Funed.
7. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Aprova as Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-rábico., Diário Oficial da União (1996).
8. Vuković, J., Matsuoka, S., Yoshimura, K., Jurišić Grubešić, R., Kremer, D., & Šantić, N. (2012). Development and Validation of a Sensitive and Fast Solid-phase Spectrophotometric Procedure for Phenol Determination in Pharmaceuticals. *Analytical Sciences*, 28(4), 397–402. <https://doi.org/10.2116/analsci.28.397>
9. El-Gindy, A., Nassar, M. W., Attia, K. A.-S., Abu-Seada, H. H., & El-Ghandour, M. (2014). High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Determination of Ranitidine HCl and Phenol in Injections. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 1(5).
10. Kolesnikova, O. N., Runova, O. B., & Ustinnikova, O. B. (2018). Development and Validation of a Gas-Chromatographic Method for Quantitative Determination of Phenol

- in Biologicals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(5), 478–482. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1843-0>
11. Yang, G., Liu, X., Yang, H., Ma, X., & Feng, Y. (2018). ANALYSIS OF PHENOLS AND OXIDATION INTERMEDIATES IN COKING WASTEWATER BY HPLC. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 63(3), 4032–4035. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000304032>
  12. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências., Diário Oficial da União (2017).
  13. CASTRO, B. C. R. (2019). *A Funed COMO UMA ORGANIZAÇÃO PÚBLICA PARA A INOVAÇÃO: uma proposta de estrutura organizacional para a área de pesquisa e desenvolvimento*. Universidade Federal de Minas Gerais.
  14. Candan Eryilmaz, & Ayten Genç. (2021). Review of Treatment Technologies for the Removal of Phenol from Wastewaters. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 43(2), 145–154. <https://doi.org/10.3103/S1063455X21020065>
  15. Saputera, W. H., Putrie, A. S., Esmailpour, A. A., Sasongko, D., Suendo, V., & Mukti, R. R. (2021). Technology Advances in Phenol Removals: Current Progress and Future Perspectives. *Catalysts*, 11(8), 998. <https://doi.org/10.3390/catal11080998>
  16. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. (2008). *Toxicological Profile for Pheno*.
  17. Alkalay-Gut, K. (2021). Chronicling medical progress: W. E. Henley, Joseph Lister, and recovery. *Journal of Poetry Therapy*, 34(3), 164–180. <https://doi.org/10.1080/08893675.2021.1921476>
  18. COUTEUR, P. L., & BURRESON, J. (2006). Fenol. In *Os botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história* (pp. 118–136). Zahar.
  19. Al-Khalid, T., & El-Naas, M. H. (2012). Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(16), 1631–1690. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>
  20. DOWNS, J., & WILLS, B. K. (2022). *Phenol Toxicity*. National Center for Biotechnology Information. StatPearls Publishing LLC.

21. ELDER, D. P., & CROWLEY, P. J. (2017). *Antimicrobial Preservatives Part Three: challenges facing preservative systems.*
22. Meyer, B. K., Ni, A., Hu, B., & Shi, L. (2007). Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(12), 3155–3167. <https://doi.org/10.1002/jps.20976>
23. Duan, W., Meng, F., Cui, H., Lin, Y., Wang, G., & Wu, J. (2018). Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 441–456. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.089>
24. PUBLIC HEALTH ENGLAND PUBLICATIONS. (2016). *PHENOL: toxicological overview.*
25. Mohamad Said, K. A., Ismail, A. F., Abdul Karim, Z., Abdullah, M. S., & Hafeez, A. (2021). A review of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*, 151, 257–289. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.05.015>
26. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2007). *Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials.*
27. Schmidt, R. J. (2005). Industrial catalytic processes—phenol production. *Applied Catalysis A: General*, 280(1), 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2004.08.030>
28. Fortuin, J. P., & Waterman, H. I. (1953). Production of phenol from cumene. *Chemical Engineering Science*, 2(4), 182–192. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(53\)80040-0](https://doi.org/10.1016/0009-2509(53)80040-0)
29. Zakoshansky, V. M. (2007). The cumene process for phenol-acetone production. *Petroleum Chemistry*, 47(4), 273–284. <https://doi.org/10.1134/S096554410704007X>
30. Bruk, A. Yu., Turbina, B. I., & Gaishun, K. A. (1969). Determination of impurities in phenol and phenolic products by gas-liquid chromatography. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*, 5(3), 229–231. <https://doi.org/10.1007/BF00719021>
31. American Society for Testing Materials. (2003). *Standard Test Method for Analysis of Phenol by Capillary Gas Chromatography.*

32. American Society for Testing Materials. (1999). *Standard Test Methods for Gas Chromatographic Analysis of Major Organic Impurities in Phenol Produced by the Cumene Process*.
33. Agência Europeia das Substâncias Químicas. (2006). *Phenol: Summary Risk Assessment Report*.
34. Baynazarov, I. Z., Lavrenteva, Y. S., Akhmetov, I. V., & Gubaydullin, I. M. (2018). Mathematical model of process of production of phenol and acetone from cumene hydroperoxide. *Journal of Physics: Conference Series*, 1096, 012197. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1096/1/012197>
35. Farmacopeia Brasileira: Monografias – Produtos Biológicos. Vol 2., Pub. L. No. Vol 2, Brasília (2019).
36. Dreijer Van Der Glas, S. M., Schalekamp, T., De Jong, H. J., & Bult, A. (1983). Determination of phenol in the presence of resorcinol applying substitution with excess bromine water; structure of the bromination products. *Pharmaceutisch Weekblad*, 5(2), 70–73. <https://doi.org/10.1007/BF01960079>
37. CHRISTIAN, G. D., DASGUPTA, P. K., & HCHUG, K. A. (2013). *Analytical Chemistry* (7th ed., Vol. 1). John Wiley & Sons.
38. Agência Europeia das Substâncias Químicas. (2015). *SUBSTANCE EVALUATION CONCLUSION as required by REACH Article 48 and EVALUATION REPORT for 2,4,6-tribromophenol*.
39. Ohlweiler, O. A. (n.d.). *Química Analítica Quantitativa: Vol. Vol 1* (2nd ed.). Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.
40. Vogel, A. I. (2002). *Análise Química Quantitativa* (6th ed.). LTC-. Editora.
41. HARRIS, D. C. (2010). *QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
42. SKOOG, D., WEST, D., HOLLER, J., & CROUCH, S. (2006). *Fundamentos de química analítica* (8th ed., Vol. 1). Editora Thomson,.

43. Mosae Selvakumar, P. (2018). Phenol Sensing Studies by 4-Aminoantipyrine Method-A Review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(2). <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.05.555657>
44. Vuković, J., Matsuoka, S., Yoshimura, K., Grdinić, V., & Grubešić, R. J. (2007). Development and prevalidation of a method for phenol determination by solid-phase spectrophotometry. *Microchimica Acta*, 159(3–4), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0748-5>
45. Brilenok, N. S., Bakhareva, M. V., & Vershinin, V. I. (2018). UV-Spectrometric Determination of Total Phenols Using Diazotized Sulfanilic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 73(6), 551–559. <https://doi.org/10.1134/S1061934818060047>
46. Pereira, F. J., Rodríguez-Cordero, A., López, R., Robles, L. C., & Aller, A. J. (2021). Development and Validation of an RP-HPLC-PDA Method for Determination of Paracetamol, Caffeine and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceuticals*, 14(5), 466. <https://doi.org/10.3390/ph14050466>
47. Dong, M. W. (2006). *MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS* (1st ed.). JOHN WILEY & SONS.
48. Li, B., Guo, W., & Ramsey, E. D. (2019). Determining phenol partition coefficient values in water- and industrial process water-supercritical CO<sub>2</sub> systems using direct aqueous SFE apparatus simultaneously interfaced with on-line SFC and on-line HPLC. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, 104558. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104558>
49. Park, S.-R., Park, S.-J., Jeong, M.-J., Choi, J. C., & Kim, M. (2018). Fast and simple determination and exposure assessment of bisphenol A, phenol, *p*-tert-butylphenol, and diphenylcarbonate transferred from polycarbonate food-contact materials to food simulants. *Chemosphere*, 203, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.185>
50. Kepekci Tekkeli, S. E., Kiziltas, M. V., Dincel, D., Erkoc, R., & Topcu, G. (2016). Simultaneous Determination of Phenol and *p*-Cresol in Human Urine by an HPLC Method. *Acta Chromatographica*, 28(2), 255–262. <https://doi.org/10.1556/1326.2016.28.2.12>
51. Venugopal, N., Vijaya Bhaskar Reddy, A., & Madhavi, G. (2014). Development and validation of a systematic UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of three

- phenol impurities in ritonavir. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 90, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.029>
52. Marson, B., Concentino, V., Junkert, A., Fachi, M., Vilhena, R., & Pontarolo, R. (2020). VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170589>
53. SOUZA, S. V. C. (2007). *PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODOS DE ENSAIO: DELINEAMENTO E APLICABILIDADE EM ANÁLISES DE ALIMENTOS*.
54. Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
55. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA. (2020). *DOQCGCRE-008, revisão 09: Orientação sobre validação de métodos analíticos*. INMETRO.
56. RILEY, C. M., CLARKE, A. M., & KIKOVSKA-STOJANOVSKA, E. (2020). Assay and impurities: method validation. In *SPECIFICATION OF DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS: development and validation of analytical methods* (2nd ed., pp. 299–320). Elsevier Ltd.
57. ERMER, J. (2005). Performance Parameters, Calculations and Tests. In J. ERMER & J. H. M. MILLER (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: a guide to best practice* (pp. 21–194). Wiley-Vch.
58. ROSANSKE, T. W. (2020). General principles and regulatory considerations: method validation. In *SPECIFICATION OF DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS: development and validation of analytical methods* (2nd ed., pp. 43–57). Elsevier Ltd.
59. SWARTZ, M. E., & SWARTZ, M. E. (2012). Method Validation Basics. In M. E. SWARTZ & I. S. KRULL (Eds.), *Handbook of ANALYTICAL VALIDATION* (pp. 61–79). Taylor & Francis Group.
60. Jenke, D. R. (1996). Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of Liquid*

*Chromatography & Related Technologies*, 19(5), 737–757.  
<https://doi.org/10.1080/10826079608005534>

61. Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S., Boulanger, B., & Hubert, P. (2007). Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 111–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.111>
62. Shewiyo, D. H., Kaale, E., Risha, P. G., Dejaegher, B., Smeyers-Verbeke, J., & Heyden, Y. Vander. (2012). HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 11–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.034>
63. KAZAKEVICH, Y., & LOBRUTTO, R. (2007). *HPLC FOR PHARMACEUTICAL SCIENTISTS* (1st ed.). JOHN WILEY & SONS.
64. Miller, J. N., Miller, J. C., & Miller, R. D. (2018). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (7th ed., Vol. 1). Pearson Longman.
65. Morettin, P. A., & Bussab, W. O. (2017). *Estatística Básica* (9th ed., Vol. 1). Saraiva.
66. Ellison, S. L. R., Barwick, V. J., & Farrant, T. J. D. (2009). *Practical Statistics for the Analytical Scientist* (2nd ed., Vol. 1). The Royal Society of Chemistry.
67. Smith, H., & Draper, N. R. (1998). *Applied Regression Analysis* (3rd ed., Vol. 1). Wiley-Interscience.
68. Gooding, J. J., & Hibbert, D. B. (2006). *Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists* (1st ed., Vol. 1). OXFORD UNIVERSITY PRESS.
69. MYERS, R. H., MONTGOMERY, D. C., VINING, G. G., & ROBINSON, R. (2010). *Generalized Linear Models With Applications in Engineering and the Sciences: Vol. Vol 1*. (2nd ed.). John Wiley & Sons.
70. PIRES, A. M., & BRANCO, J. A. (2007). *Introdução aos Métodos Estatísticos Robustos*. Sociedade Portuguesa de Estatística.



71. BELSLEY, D. A., KUH, E., & WELSCH, R. (2004). *Regression Diagnostics: Identifying Influential Data and Sources of Collinearity* (1st ed., Vol. 1). John Wiley & Sons.
72. Miot, H. A. (2017). Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*, 16(2), 88–91. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.041117>
73. Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests . *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21–33.
74. Pino, F. A. (2014). A QUESTÃO DA NÃO NORMALIDADE: uma revisão. *Rev. de Economia Agrícola*, 6(2), 17–33.
75. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591. <https://doi.org/10.2307/2333709>
76. Douglas C. Montgomery, Elizabeth A. Peck, & G. Geoffrey Vining. (2012). DETECTING AUTOCORRELATION. In *Introduction to Linear Regression Analysis* (5th ed., pp. 474–480). John Wiley & Sons.
77. Miranda, V. F. L. (2004). *Avaliação Monte Carlo de Testes Assintóticos e de Bootstrap para Autocorrelação Residual* [Dissertação]. Universidade Federal de Lavras.
78. Durbin, J., & Watson, G. S. (1951). Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. *Biometrika*, 38(1/2), 159. <https://doi.org/10.2307/2332325>
79. Tiago Aparecido da Silva. (2023). *METROLOGIA QUÍMICA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO ALTERNATIVO AO UV-VIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL EM SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO*. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.
80. Association of Official Analytical Chemists. (2002). *Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*.
81. Price, J. A., Rogers, J. V., Wendling, M. Q. S., Plahovinsak, J. L., Perry, M. R., Reid, F. M., Kiser, R. C., & Graham, J. S. (2011). Temporal effects in porcine skin following bromine vapor exposure. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 30(3), 187–197. <https://doi.org/10.3109/15569527.2010.546003>

82. Jayaweera, D., Islam, S., Gunja, N., Cowie, C., Broska, J., Poojara, L., Roberts, M. S., & Isbister, G. K. (2017). Chloroform ingestion causing severe gastrointestinal injury, hepatotoxicity and dermatitis confirmed with plasma chloroform concentrations. *Clinical Toxicology*, *55*(2), 147–150. <https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1249795>
83. Gupta, N., Sonambekar, A., Daksh, S., & Tomar, L. (2013). A rare presentation of methanol toxicity. *Annals of Indian Academy of Neurology*, *16*(2), 249. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.112484>
84. Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F., & Silveira, C. da C. (2003). “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, *26*(1), 123–129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100020>
85. T.W. GRAHAM SOLOMONS, & CRAIG B. FRYHLE. (2012). Reações de Compostos Aromáticos. In *Química Orgânica* (10th ed., Vol. 2, pp. 95–145). LTC.
86. Sprung, M. M. (1941). Bromination of Phenols by Means of Bromide-Bromate Solution. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, *13*(1), 35–38. <https://doi.org/10.1021/i560089a011>
87. Aichenegg, P., & Haynes, H. G. (2007). The determination of o-cresol, 4-chloro-2-methylphenol and 2-methylphenoxyacetic acid by quantitative bromination. *Journal of Applied Chemistry*, *4*(3), 137–140. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010040308>
88. Ruderman, I. W. (1946). Bromination of Phenols and Phenol Alcohols. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, *18*(12), 753–759. <https://doi.org/10.1021/i560160a007>
89. Kohn, M. (1951). Bromination of Catechol. *Journal of the American Chemical Society*, *73*(1), 480–480. <https://doi.org/10.1021/ja01145a519>

## APÊNDICE A – PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL PELO MÉTODO DE KOPEERCHAAR

### Preparo da solução de amido 2% m v<sup>-1</sup>

Mediu-se a massa aproximada de 2,0 g de amido em béquer de 250 mL e adicionou-se 100,0 mL de água purificada quente (temperatura aproximada de 80 °C) com auxílio de pipeta graduada. Homogeneizou-se a solução com o auxílio de bastão de vidro.

### Preparo da solução de bromo 0,05 mol L<sup>-1</sup>

Mediu-se a massa aproximada de 3,0 g de bromato de potássio P.A. e 15,0 g de brometo de potássio em béquer de 50,0 mL. Transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume do balão com água purificada e homogeneizou-se a solução.

### Padronização da solução de bromo 0,05 mol L<sup>-1</sup>

Pipetou-se, em triplicata, 25,0 mL da solução de bromo 0,05 mol L<sup>-1</sup> com o auxílio de pipeta volumétrica e transferiu-a para um Erlenmeyer de 500 mL com tampa.

Adicionou-se 120 mL de água purificada e 5,0 mL de ácido clorídrico P.A. medidos em proveta. O Erlenmeyer foi tampado e agitado suavemente.

Adicionou-se 5,0 mL de iodeto de potássio 20% m v<sup>-1</sup> medidos em proveta. O Erlenmeyer foi novamente tampado e acondicionado repouso por 5 minutos ao abrigo de luz.

Em uma bureta de 50,00 mL, adicionou-se tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e iniciou-se a titulação;

Quando a solução adquiriu coloração amarela, adicionou-se 3,0 mL de amido 2% m v<sup>-1</sup> e continuou a titulação até viragem para incolor.

A molaridade da solução foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$c = \frac{(V_1 - V_2) \times C_1}{50} \quad (1)$$

Onde:

c: concentração da solução de bromo, em mol L<sup>-1</sup>;

C<sub>1</sub>: concentração do tiosulfato de sódio recentemente padronizado, em mol L<sup>-1</sup>;

V<sub>1</sub>: volume gasto de tiosulfato de sódio na titulação da solução de bromo, em mL;

V<sub>2</sub>: volume gasto de tiosulfato de sódio na titulação do branco, em mL.

**Preparo da solução de iodeto de potássio 20% m v<sup>-1</sup>**

Mediu-se a massa aproximada de 20,0 g de iodeto de potássio P.A. Transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 100,0 mL. Completou-se o volume do balão com água purificada isenta de dióxido de carbono e homogeneizou-se a solução.

**Preparo da solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>**

Mediu-se a massa aproximada de 25,0 g de tiosulfato de sódio penta-hidratado e de 200,0 mg de carbonato de sódio (previamente dessecado em estufa a 110 °C por 1 hora). Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume do balão com água purificada, previamente fervida e resfriada, e homogeneizou-se a solução.

**Padronização da solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>**

Mediu-se, em triplicata, a massa aproximada de 105,0 mg de dicromato de potássio, previamente pulverizado e dessecado em estufa a 110 °C por 1 hora. Transferiu-se a massa para Erlenmeyer de 500,0 mL com tampa. Foram adicionados ao Erlenmeyer a massa aproximada de 3,0 g de iodeto de potássio P.A. e 3,0 mL de ácido clorídrico P.A. Os Erlenmeyers foram tampados, suavemente agitados e acondicionados em repouso por 5 minutos ao abrigo de luz.

Em uma bureta de 50,0 mL, adicionou-se a solução de tiosulfato de sódio preparada e iniciou-se a titulação. Quando a solução adquiriu coloração amarelada, adicionou-se 0,5 mL de solução amido 2% m v<sup>-1</sup> SI. Continuou-se a titulação até a viragem, quando a solução adquiriu coloração azul escuro. A molaridade foi calculada conforme Equação 2.

$$C = \frac{M \times 100}{V \times 4,903} \quad (2)$$

Onde:

c: concentração da solução de tiosulfato de sódio, em mol L<sup>-1</sup>;

M: massa de dicromato de potássio, em g;

V: volume gasto de tiosulfato de sódio, em mL.

## **APÊNDICE B – PREPARO DA SOLUÇÕES UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE FENOL PELO MÉTODO ESPECTROMÉTRICO**

### **Solução de ácido bórico em cloreto de potássio**

Mediu-se a massa aproximada de 6,18 g de ácido bórico PA. Transferiu-se massa para balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume do balão com solução de cloreto de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e homogeneizou-se a solução.

### **Solução de hidróxido de sódio**

Mediu-se a massa aproximada de 2,0 g de hidróxido de sódio PA. Transferiu-se a massa para balão volumétrico de 500 mL. Completou-se o volume do balão com água ultrapurificada e homogeneizou-se a solução.

### **Preparo do tampão borato pH 9,0**

Transferiu-se 1000 mL da solução ácido bórico em cloreto de potássio e 420,0 mL da solução hidróxido de sódio para béquer de 2000 mL. Homogeneizou-se a solução e verificou-se o pH da solução em potenciômetro. Ajustou-se o pH para 9 utilizando a solução de ácido bórico ou hidróxido de sódio preparadas anteriormente.

### **Solução de 4-aminoantipirina a $0,1\% \text{ m v}^{-1}$**

Mediu-se a massa aproximada de 0,1 g de 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-5-pirazolona (4-aminoantipirina). Transferiu-se a massa para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão com tampão borato pH 9,0 e homogeneizou-se a solução.

### **Solução de ferricianeto de potássio a $5\% \text{ m v}^{-1}$**

Mediu-se a massa aproximada de 5,0 g de ferricianeto de potássio PA. Transferiu-se a massa para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão com água purificada e homogeneizou-se a solução.

## ANEXO A - EXTRATO DO CERTIFICADO DE ANÁLISE DO PADRÃO DE FENOL EMITIDO PELA FUNED

<b>TÍTULO: CERTIFICADO DE ANÁLISES DA MATÉRIA-PRIMA FENOL</b>	<b>NÚMERO: DI-DCQ-045-FM-0144</b>
---	---------------------------------------

Certificado de análise N°: CQ20210597	Revisão: 00	Data de emissão: 29/07/2021
N° lote Funed: MP2021050008	Tramitação: 2260.01.0006939/2021-41	
Fabricante: Exodo Científica		
Fornecedor: Hexis Científica		
N° de Volumes do Lote: 40		
Volumes amostrados plano r: 10		
N° lote fabricante: 2010276861	N° nota fiscal: 808955	
Data de fabricação: 28/10/2020	Data de validade: 28/10/2026	

ENSAIOS ANALÍTICOS		
ANÁLISES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
DESCRIÇÃO	Apresenta-se na forma de cristais aciculares incolores ou massa cristalina branca, odor característico, corrosivo, irritante para mucosas e pele, deliquescente. Escurece quando exposto ao ar e à luz. Isento de material estranho.	De acordo
IDENTIFICAÇÃO	Fenol	Teste A: Positiva Teste B: Positiva Volume a Volume: Positiva
TEMPERATURA DE CONGELAMENTO	No mínimo 39 °C.	40 °C
ASPECTO DA SOLUÇÃO	A solução de 1 g da amostra em 15 mL de água purificada é límpida.	De acordo
ACIDEZ	A solução deve desenvolver coloração amarela	De acordo
ÁGUA	No máximo 0,5%.	0,1 %

## ANEXO B - EXTRATO DO CERTIFICADO DE ANÁLISE DA AMOSTRA CONTROLE EMITIDO PELA FUNED



<b>TÍTULO: CERTIFICADO DE ANÁLISES DA MATÉRIA-PRIMA FENOL</b>	<b>NÚMERO: DI-DCQ-045-FM-0144</b>
---	-----------------------------------

Certificado de análise N°: CQ20220550	Revisão: 00	Data de emissão: 31/08/2022
N° lote Funed: MP2022050022	Tramitação: 2260.01.0009319/2022-89	
Fabricante: Exodo Científica		
Fornecedor: Distribuidora Mendonça e Miranda Ltda		
N° de Volumes do lote: 15	N° de Volumes conforme plano r: 06	
N° lote fabricante: 2110195726	N° nota fiscal: 877	
Data de fabricação: 20/10/2021	Data de validade: 20/10/2027	

ENSAIOS ANALÍTICOS		
ANÁLISES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
DESCRIÇÃO	Apresenta-se na forma de cristais aciculares incolores ou massa cristalina branca, odor característico, corrosivo, irritante para mucosas e pele, deliquescente. Escurece quando exposto ao ar e à luz. Isento de material estranho.	De acordo
IDENTIFICAÇÃO	Fenol	Teste A: Positiva Teste B: Positiva Volume a Volume: Positiva
TEMPERATURA DE CONGELAMENTO	No mínimo 39 °C.	41 °C
ASPECTO DA SOLUÇÃO	A solução de 1 g da amostra em 15 mL de água purificada é límpida.	De acordo
ACIDEZ	A solução deve desenvolver coloração amarela	De acordo
ÁGUA	No máximo 0,5%.	0,2 %
RESÍDUO POR EVAPORAÇÃO	No máximo 2,5 mg de resíduo, equivalente a no máximo 0,05%	<2,5 mg

O conteúdo apresentado neste certificado tem significado restrito e se aplica somente a este lote. As informações tratadas neste documento não devem ser divulgadas sem a autorização prévia desta diretoria ou da autoridade máxima da Instituição, sob pena de descumprimento dos direitos e deveres dispostos na Lei Estadual nº 869/1952.

Rua Conde Pereira Carneiro, nº 80 - Gamela  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.510-010  
www.funed.mg.gov.br  
e-mail: faleconosco@funed.mg.gov.br  
Tel.: 0800 283 1980



<b>TÍTULO: CERTIFICADO DE ANÁLISES DA MATÉRIA-PRIMA FENOL</b>	<b>NÚMERO: DI-DCQ-045-FM-0144</b>
---	---------------------------------------

ENSAIOS ANALÍTICOS		
ANÁLISES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
DOSEAMENTO	No mínimo 99,0% e no máximo 100,5% de Fenol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O), em relação à substância anidra.	99,9 %
OBSERVAÇÃO		
NA		
CONCLUSÃO		
APROVADO		
REFERÊNCIAS		
EMP 0163 - Fenol - Revisão 03		

Tiago Aparecido da Silva

Masp: 1373622-4

Químico - CRQ/MG 02417042

Serviço de Controle Físico-Químico

Fundação Ezequiel Dias

01/09/22

Serviço de Controle Físico-Químico

Leonardo Alvarenga de Paula Freitas

01/09/22

Divisão de Controle de Qualidade

Leonardo Alvarenga de Paula Freitas

Masp: 1234221-8 - CRF/MG 23607

Chefe da Divisão de Controle de Qualidade

Fundação Ezequiel Dias - FUNED

O conteúdo apresentado neste certificado tem significado restrito e se aplica somente a este lote.  
As informações tratadas neste documento não devem ser divulgadas sem a autorização prévia desta diretoria ou da autoridade máxima da Instituição, sob pena de descumprimento dos direitos e deveres dispostos na Lei Estadual nº 869/1952.

Rua Conde Pereira Carneiro, nº 80 - Gameleira  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.510-010  
www.funed.mg.gov.br  
e-mail: faleconosco@funed.mg.gov.br  
Tel.: 0800 283 1980

Revisão 00    02/04/2020    Página 2 de 2