

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

Tiago Aparecido da Silva

**OBTENÇÃO DE SQC E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DOSEAMENTO DO SOLVENTE RESIDUAL TOLUENO EM SOROS
HIPERIMUNES**

Belo Horizonte (MG)

2019

Tiago Aparecido da Silva

**OBTENÇÃO DE SQC E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DOSEAMENTO DO SOLVENTE RESIDUAL TOLUENO EM SOROS
HIPERIMUNES**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química Tecnológica.
Orientador: Prof. Dr. Cleverson Fernando
Garcia.
Co-orientador: Ms. Rangel Caio Quinino
Dutra.**

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2019

Tiago Aparecido da Silva

**OBTENÇÃO DE SQC E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DOSEAMENTO DO SOLVENTE RESIDUAL TOLUENO EM SOROS
HIPERIMUNES**

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

Belo Horizonte, 01 de julho de 2019.

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

**Ms. Rangel Caio Quinino Dutra
(co-orientador - FUNED)**

**Prof. Dr. Ildefonso Binatti
(Avaliador - CEFET-MG)**

**Prof^a. Ms. Janice Cardoso Pereira Rocha
(Avaliadora – CEFET-MG)**

DEDICATÓRIA

A meu avô João Pereira do Carmo (*in memoriam*) e a minha esposa Michele Aparecida da Costa Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela inspiração de escolher a Química como área de formação e trabalho, e por todas as bênçãos em minha vida. O pai celestial sempre me mostrou com amor incondicional, seus atributos de onisciência, onipotência e onipresença.

À minha esposa Michele que foi paciente e companheira, sempre me incentivando a continuar no caminho determinado por Deus.

Aos meus pais Solange e Juarez pela confiança, incentivo aos estudos e pelas orações.

À minha irmã e meu afilhado Adryan, pessoas que me motivam a crescer e melhorar.

A Hermínio, Lorrany e Sabrina pelo exemplo de generosidade e responsabilidade.

À tia Lu por ter-me como filho e exercer com prazer seu papel de “segunda mãe”.

Aos demais familiares pelo carinho e confiança.

A Rangel Dutra pelas orientações não só neste trabalho, mas também ao longo da graduação e do convívio profissional.

A Guilherme Sena pela participação neste trabalho e por todos os momentos agradáveis que uma amizade sincera oferece.

Aos diretores, supervisores e demais amigos da Fundação Ezequiel Dias pela oportunidade de trabalho e aprendizado, bem como o respeito e compreensão demonstrados no ambiente profissional.

Ao meu orientador, professor Cleverson Garcia pela atenção, compreensão e disponibilidade que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

À professora Janice Rocha pelas excelentes aulas de química analítica e por todas as orientações que me fizeram evoluir como estudante e profissional.

Ao coordenador do curso de química tecnológica, professor Márcio Basílio e aos demais professores que contribuíram para minha formação.

Aos amigos André Gonçalves e Josemar, pelos momentos de estudo, conversas e por todas as experiências adquiridas ao longo do curso de química tecnológica.

Aos demais amigos do CEFET-MG.

A Diego, Diogo e Phillip, amigos e irmãos que sempre estiveram presentes nos momentos importantes da minha vida. Aqui não poderia ser diferente.

RESUMO

SILVA, T. A.; GARCIA, C. F.; DUTRA, R. C. Q. Obtenção de SQC e validação de metodologia analítica para doseamento do solvente residual tolueno em soros hiperimunes.

Soros hiperimunes para uso humano são recursos terapêuticos utilizados em pacientes que se envolveram em acidentes com animais peçonhentos, sendo importantes também no tratamento de patologias tais como raiva e tétano. Em Minas Gerais esses tipos de soros são produzidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), que utiliza no seu processo produtivo o tolueno, substância química que em concentrações elevadas torna-se prejudicial aos seres humanos. Por ser utilizado em um processo de fabricação de medicamento e ter toxicidade considerável, o tolueno é classificado como solvente residual. Sendo assim, sua concentração no produto final deve ser quantificada para garantir que essa dosagem não seja prejudicial ao usuário que já se encontra enfermo. Devido a essa necessidade, no presente trabalho realizou-se a validação analítica de um método via cromatografia gasosa para determinação do teor de tolueno nos soros produzidos pela FUNED. O padrão de análise foi obtido por meio da caracterização de uma amostra de tolueno PA, utilizando-se as técnicas de espectroscopia de UV-Vis, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas, quando se conseguiu uma substância química de referência (SQR) mais economicamente viável que as comumente usadas. Na validação analítica constatou-se que os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação geraram resultados condizentes com as normas vigentes, portanto o método foi considerado adequado para o fim proposto e pode ser implantado no controle de qualidade dos soros hiperimunes produzidos pela Fundação Ezequiel Dias.

Palavras-chave: Solventes residuais. Soros hiperimunes. Tolueno. Validação analítica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural do tolueno	3
Quadro 1 – Soros produzidos na Fundação Ezequiel Dias.....	5
Figura 2 – Etapas de obtenção dos diversos tipos de soro	6
Quadro 2 – Solventes residuais de classe 3	10
Quadro 3 – Solventes residuais de classe 4	11
Quadro 4 – Condições para avaliação da robustez de um método	19
Figura 3 – Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás	21
Quadro 5 – Parâmetros da análise cromatográfica da amostra de solvente residual.....	26
Quadro 6 – Método cromatográfico utilizado na caracterização do tolueno.....	28
Quadro 7 – Método cromatográfico utilizado na quantificação do tolueno.....	29
Quadro 8 – Realização dos testes de exatidão e precisão.....	333
Quadro 9 – Distribuição de variáveis para o teste de Younden Steiner	344
Quadro 10 – Variáveis para teste de robustez	34
Quadro 11 – Condições de análise do teste de robustez.....	35
Figura 4 – Espectro de ultravioleta-visível do tolueno.....	36
Figura 5 – Espectro de infravermelho do tolueno	37
Quadro 12 – Principais interações obtidas no espectro de IV do tolueno.	37
Figura 6 – Espectro de massas do tolueno.....	38
Esquema 1 – Proposta de fragmentação do tolueno	39
Figura 7 – Cromatograma do tolueno.....	40
Figura 8 – Cromatograma da acetona.....	40
Figura 9 – Cromatograma do padrão combinado de tolueno e acetona	41
Figura 10 – Cromatograma do soro hiperimune.....	41
Figura 11 – Cromatograma da solução problema fortificada	42
Gráfico 1 – Dispersão de pontos com regressão linear	44
Gráfico 2 – Correlação entre os resíduos da curva usual	45
Gráfico 3 – Dispersão de pontos com regressão linear definitiva	47
Gráfico 4 – Distribuição final dos resíduos	47
Gráfico 5 – Regressão linear para a curva matrizada sem tratamento estatístico.....	49
Gráfico 6 – Correlação entre os resíduos da curva matrizada	50
Gráfico 7 – Modelo final da curva matrizada.....	52
Gráfico 8 – Distribuição dos resíduos da curva matrizada.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solventes residuais de classe 1 e respectivos limites de concentração	8
Tabela 2- Solventes residuais de classe 2 e os respectivos limites de concentração.....	9
Tabela 3 - Parâmetros considerados para a validação analítica	12
Tabela 4 – Detectores para cromatografia gasosa	22
Tabela 5 - Preparo de soluções padrões intermediárias para o teste de linearidade.....	31
Tabela 6 - Níveis de concentração da curva usual	32
Tabela 7- Níveis de concentração da curva matrizada	32
Tabela 8 – Obtenção do teor final do tolueno	39
Tabela 9 - Dados comparativos entre os solventes tolueno e acetona.....	42
Tabela 10- Parâmetros dos testes de linearidade	43
Tabela 11 - Resultados referentes à curva matrizada	48
Tabela 12 - Intervalos de confiança da intercessão e inclinação das curvas de calibração.....	53
Tabela 13 – Valores de recuperação para teste de precisão	54
Tabela 14– DPR calculado por nível de concentração	55
Tabela 15 – Resultados da análise da robustez.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação de Químicos Analíticos Oficiais).
CG	Cromatógrafo Gasoso
CGDIC	Cromatografia Gasosa por Ionização em Chama
CGEM	Cromatografia gasosa por Espectrometria de Massas
DI	Diretoria Industrial
DIC	Detector por Ionização em Chama
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
EDP	Exposição diária permitida
EM	Espectrômetro de Massas
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferência Internacional sobre Harmonização)
IE	Impacto de elétrons
IFA's	Insumos farmacêuticos ativos
IQ	Ionização química
LD	Limite de detecção
LFS	Lote Final de Soro
LQ	Limite de quantificação
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de padrões e tecnologia)
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i> (Administração de segurança e saúde ocupacional)
PA	Para análise
SCFQ	Serviço de Controle Físico-Químico
SCG	Soro concentrado a granel
SNC	Sistema nervoso central

SPAG	Soro Produto acabado a granel
SQC	Substância química de referência caracterizada
SQF	Substância química de referência farmacopeica
SQR	Substância química de referência
SR	Solventes residuais

LISTA DE SÍMBOLOS

r	Coeficiente de correlação
r^2	Coeficiente de determinação
%	Porcentagem
σ	Desvio padrão populacional
C^*	Carbono ativo
eV	Elétron Volt
m/z	Razão massa por carga
M^+	Íon molecular
$M + H^+$	Íon pseudomolecular
λ	Comprimento de onda
π	Ligação dupla
α	Nível de significância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Tolueno	3
2.2 Produção de soros hiperimunes na FUNED	4
2.3 Solventes residuais	7
2.3.1 Solventes residuais da Classe 1.....	8
2.3.2 Solventes residuais da Classe 2.....	8
2.3.3 Solventes residuais da Classe 3.....	10
2.3.4 Solventes residuais da Classe 4.....	11
2.4 Validação analítica.....	11
2.4.1 Seletividade.....	13
2.4.2 Linearidade	13
2.4.3 Precisão	15
2.4.4 Exatidão	16
2.4.5 Limite de Detecção	16
2.4.6 Limite de Quantificação.....	17
2.4.7 Robustez.....	18
2.5 Cromatografia a gás	19
2.5.1 Cromatografia gasosa por ionização de chama.....	22
2.5.2 Cromatografia gasosa por espectrometria de massas (CGEM)	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Amostras	26
3.2 Reagentes e Solventes	26
3.3 Método a ser validado.....	26
3.4 Procedimentos	27
3.4.1 Caracterização do tolueno.....	27
3.4.1.1 Espectroscopia na região do ultravioleta e do visível.....	27
3.4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho	27
3.4.1.3 Espectrometria de Massas	27
3.4.2 Determinação do teor da SQC	28
3.4.3 Validação analítica.....	29
3.4.3.1 Seletividade	29
3.4.3.2 Linearidade	31
3.4.3.3 Precisão e exatidão	33

3.4.3.4 Robustez	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 Caracterização do tolueno.....	36
4.1.1 Espectroscopia de UV-Vis	36
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho.....	37
4.1.3. Espectrometria de massas	38
4.2 Determinação do teor da SQC.....	39
4.3 Validação analítica.....	40
4.3.1 Seletividade.....	40
4.3.2 Linearidade.....	42
4.3.2.1 Curva usual	42
4.3.2.2 Curva matrizada	48
4.3.2.3 Comparação entre as curvas usual e matrizada.....	53
4.3.3. Precisão e exatidão.....	53
4.3.4 Robustez.....	55
4.3.5 Limites de detecção e quantificação	56
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A saúde do ser humano sempre foi um fator de relevância social e, por isso, tratada com cuidado especial, tanto na profilaxia quanto no tratamento de doenças. A prevenção de uma doença qualquer é algo mais simples de ser feito quando comparada ao tratamento desta, pois, enquanto que no primeiro caso a responsabilidade maior é do indivíduo, no segundo caso a cadeia de responsabilidade é mais ampla. A responsabilidade no tratamento de uma doença qualquer começa pelo produtor do medicamento que deve assegurar que o produto esteja compatível com o esperado, de forma que, além de tratar a doença, o medicamento não provoque reações indesejáveis inesperadas. Conseqüentemente, as indústrias farmacêuticas devem garantir a qualidade do produto que será entregue ao consumidor final.

A fim de garantir a qualidade de seus produtos, as indústrias farmacêuticas se norteiam por legislações específicas e implementam sistemas de qualidade exigidos por órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além de direcionar, cabe também à ANVISA fiscalizar as atividades realizadas, bem como emitir certificados que comprovem que os produtores de medicamentos estão fornecendo produtos seguros ao consumidor final. Diante do exposto, torna-se lógico pensar que uma indústria farmacêutica de referência certamente será balizada pelos critérios anteriormente citados, como por exemplo a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), importante órgão público do estado de Minas Gerais que além de atuar nas áreas de análises clínicas e pesquisa em saúde, é referência em produção farmacêutica, sendo um dos destaques do seu portfólio de medicamentos os soros hiperimunes para uso humano. Neste trabalho este medicamento será citado algumas vezes como soro hiperimune, ou simplesmente soro.

Os soros hiperimunes são medicamentos de extrema importância para a saúde da população e cruciais no tratamento de casos envolvendo ataques de animais peçonhentos, infecções virais e intoxicações e atualmente a FUNED é uma das mais importantes fornecedoras deste medicamento no Brasil, especialmente para o Ministério da Saúde que o distribui para todo país.

Assim como ocorre em outros processos de fabricação de medicamentos, durante a produção dos soros hiperimunes são utilizados solventes orgânicos, destacando-se entre estes o tolueno, solvente de toxicidade considerável. Logo, é crucial verificar se o processo produtivo é capaz de eliminar o solvente ou reduzi-lo abaixo do limite especificado pela legislação vigente.

A análise de solventes residuais, como o tolueno, no Brasil é uma prática recente e, por isso, não há metodologias de análises pré-definidas como ocorre para a maioria dos fármacos levando, muitas vezes, o produtor do medicamento a desenvolver e validar métodos de análise específicos para o solvente residual de interesse, atendendo às legislações vigentes e, principalmente, eliminando os riscos dessas substâncias causarem algum malefício ao consumidor final.

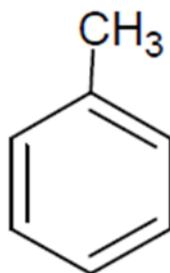
Dado o contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar e quantificar um reagente tolueno PA (Para análise) como padrão de análise que possibilite validar um método cromatográfico do Serviço de Controle Físico-Químico (SCFQ) da FUNED, desenvolvido para quantificar tolueno como solvente residual de soros hiperimunes produzidos na referida Instituição.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tolueno

O tolueno ou metil benzeno (Figura 1) é um hidrocarboneto aromático, líquido e incolor, com odor característico, derivado do alcatrão da hulha (AZEVEDO, 2004). Apresenta fórmula molecular C_7H_8 , possui massa molecular igual a 92,15 u e temperatura de ebulição igual a $110,6^{\circ}C$; sua pressão de vapor é igual a 22 mmHg a $20^{\circ}C$; autoinflama a $480^{\circ}C$; e seu limiar de odor de vapores ocorre entre 0,04 e 1 $mg L^{-1}$ na água e 8 $mg m^{-3}$ no ar (FORSTER; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.; 1994). O tolueno é um composto aromático de considerável estabilidade, devido à ressonância eletrônica, mas, ainda assim, pode sofrer reações de substituição eletrofílica orientadas pelo grupo metila (orientador orto-para e ativador do anel benzênico) (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Figura 1- Fórmula estrutural do tolueno



Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2001.

O tolueno é considerado um solvente tóxico, sendo a principal via de introdução no organismo humano o sistema respiratório, pois seus vapores, ao atingir os pulmões, podem facilmente se difundir ao longo de uma ampla superfície e penetrar na corrente sanguínea. A segunda via potencial de exposição é a pele e sua taxa de absorção varia de 14 a 23 $mg cm^{-2} h^{-1}$, podendo causar ressecamento e irritação (FORSTER; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.; 1994). Segundo Azevedo (2004), o tolueno é um solvente com alta volatilidade, mas seus vapores não se dispersam facilmente para a atmosfera, permanecendo próximos ao solo, o que aumenta a penetração pela via respiratória.

Em se tratando de ambiente de trabalho, a exposição ao tolueno ocorre a partir do uso ocupacional. Por sua vez, no ambiente doméstico, por meio da inalação com fins de abuso e da exposição ambiental (KULAY; FRANCO; AUGUSTO, 2012).

Devido à sua considerável toxicidade, o tolueno deve ser sempre monitorado quanto à concentração máxima da exposição que assegurará a saúde do indivíduo. No Brasil, o limite

de exposição, considerado apenas por via respiratória, é de 78 ppm em até 48 horas por semana (Brasil, 1978). Nos Estados Unidos, de acordo com (USA, 1971), os limites de exposição recomendados pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA) para o tolueno foram estabelecidos para evitar efeitos no sistema nervoso, considerando exposição a longo prazo, sendo estes: 200 ppm nas indústrias em geral e 750 ppm nas indústrias marítimas e de construção civil, em jornadas de trabalho de 8 horas por dia. No entanto, é importante salientar que parte desses trabalhadores apresentaram sintomas em atividades onde as exposições são mais baixas do que os limites anteriormente citados.

Outro ponto negativo, do ponto de vista toxicológico, é que o tolueno, por ser uma substância orgânica lipossolúvel, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade, produzindo uma alteração no estado de consciência, similar aos níveis mais leves de anestesia (FORSTER; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.; 1994). O principal efeito se dá no sistema nervoso central (SNC), tanto em animais como nos seres humanos, levando a uma ação predominantemente depressora (AZEVEDO, 2004).

Gonzalez *et al.* (2010), por sua vez, afirmam que o tolueno atua sobre o sistema nervoso central em exposições agudas e crônicas, apresenta ação irritante sobre a pele e mucosas e seus efeitos agudos são semelhantes aos decorrentes da intoxicação etanólica: efeitos estimulantes seguidos de depressão do SNC. Os autores ainda citam que em exposições crônicas, o tolueno pode provocar hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e perda auditiva. Segundo Kulay, Franco e Augusto (2012), estudos evidenciam que a exposição a altas concentrações de tolueno, pelas diferentes vias de administração (oral, inalação ou subcutânea) acentuam a perda auditiva.

Os efeitos agudos causados pelo tolueno são reversíveis, mas tornam-se mais severos e persistentes com o aumento da concentração e/ou duração da exposição. Salienta-se que não há relato do efeito tóxico em seres humanos expostos a níveis menores que 50 ppm por curtos períodos de tempo ou expostos uma única vez a 100 ppm, por poucas horas. Mas, há relatos de convulsões, até mesmo chegando ao *status epilepticus*, como primeira manifestação de intoxicação aguda (FORSTER; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.; 1994).

2.2 Produção de soros hiperimunes na FUNED

Soros hiperimunes para uso humano são definidos 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 (BRASIL, 2010).

Os primeiros soros produzidos no Brasil datam do início do século XX através dos trabalhos do médico Vital Brasil e desde então continuam sendo os principais medicamentos empregados no tratamento de acidentes com animais peçonhentos (SILVA, 2008).

Observou-se em Brasil (2019) que, entre 2007 e 2017, foram notificados 95.205 ataques de animais peçonhentos somente num grupo composto por trabalhadores do campo, floresta e águas. Diante do exposto pode se inferir que os soros hiperimunes são de importância significativa para a sociedade brasileira e principalmente para a população da zona rural.

A FUNED por meio de sua diretoria industrial (DI) é a única produtora de soros hiperimunes em Minas Gerais e uma das principais fornecedoras em todo o Brasil. Após o fornecimento ao Ministério da Saúde os soros são disponibilizados para os hospitais públicos de todo o país para tratamento de picadas de animais peçonhentos e para infecções por tétano e raiva. Atualmente a FUNED está apta a produzir os 8 tipos de soros descritos no Quadro 1 (MINAS GERAIS, 2018).

Quadro 1 - Soros produzidos na Fundação Ezequiel Dias

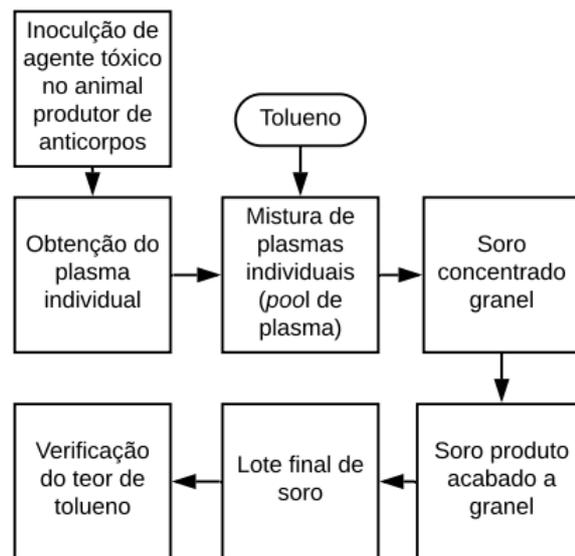
Tipo de soro	Aplicação
Antibotrópico pentavalente	Envenenamento por jararacas (Gênero <i>Bothrops</i>).
Antibotrópico pentavalente e anticrotálico	Envenenamentos por jararacas ou cascavéis (Gênero <i>Crotalus</i>).
Antibotrópico pentavalente e antilaquético	Envenenamento por jararacas e surucucu (Gênero <i>Lachesis</i>).
Anticrotálico	Envenenamento por cascavel (Gênero <i>Crotalus</i>).
Antielaídico bivalente	Envenenamento por corais verdadeiras (Gênero <i>Micrurus</i>).
Antiescorpiônico	Envenenamento por qualquer espécie de escorpião (Gênero <i>Tytilus</i>).
Antirrábico	Em casos de ferimentos graves provocados pela mordedura de animal suspeito.
Antitetânico	Neutralização das toxinas secretadas pelo bacilo tetânico (<i>Clostridium tetani</i>).

Fonte: Minas Gerais, 2018.

Para a produção de soros hiperimunes a FUNED mantém um criadouro de mais de 200 serpentes, quatro mil escorpiões e uma fazenda experimental, localizada em Betim (MG).

Nesta fazenda cria-se equinos produtores que fornecem o plasma hiperimune utilizado para produção dos soros. Antes de ser disponibilizado para o Ministério da Saúde os soros produzidos pela FUNED passam por um rigoroso controle de qualidade durante todo o processo de produção, que se subdivide nas etapas descritas na Figura 2 que também mostra a etapa em que se utiliza o tolueno no processo (MINAS GERAIS, 2018).

Figura 2 - Etapas de obtenção dos diversos tipos de soro



Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2017.

Conforme demonstrado na Figura 2, após inoculação do animal produtor obtém-se o plasma individual chamado também de plasma hiperimune, ou seja, rico em anticorpos que neutralize o agente tóxico. Após a mistura do plasma obtido da sangria de mais de um animal obtém-se o denominado *pool* de plasma, que ao passar pelos processos de digestão, purificação, concentração e dessalinização transforma-se no chamado Soro Concentrado a Granel (SCG) (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2017).

A utilização do tolueno no processo de produção dos soros, se justifica para fins de purificação. Após o processo de digestão do *pool* de plasma este é purificado de forma a eliminar diversas proteínas (que não as imunoglobulinas) e outros componentes que não sejam de interesse. O tolueno especificamente é adicionado para eliminar cadeias lipídicas que possam estar presentes nesta mistura (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2015).

O subproduto obtido após o SCG denomina-se Soro Produto Acabado a Granel (SPAG), que consiste numa preparação estéril de imunoglobulinas purificadas, diluída,

proveniente de um ou mais SCG, de composição uniforme e com qualidade estabelecidas pelas normas vigentes. O produto final obtido na planta de produção de soros, é o chamado Lote Final de Soro (LFS), que consiste no SPAG envasado em ampolas ou frasco-ampola, em processo único, identificado e produzido de acordo com um único protocolo de produção (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2017).

Devido a sua toxicidade o tolueno deve ser eliminado durante o processo de produção dos soros, principalmente quando se considera que a administração do medicamento no paciente se dá de forma intravenosa, ou seja, se este reagente estiver presente nos soros acima do limite permitido o contato com a corrente sanguínea é imediato podendo intoxicar gravemente o paciente, que já se encontra debilitado. O serviço de controle físico químico (da FUNED é o responsável por determinar o teor de tolueno no LFS, garantindo que a quantidade deste reagente seja inferior a 890 ppm conforme determina Brasil (2015).

2.3 Solventes residuais

Os Solventes Residuais (SR) em produtos farmacêuticos são definidos como as substâncias químicas orgânicas voláteis usadas ou produzidas durante a fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) ou excipientes, ou na preparação de produtos acabados (BRASIL, 2015).

O solvente, se utilizado corretamente na síntese de uma substância medicamentosa, pode aumentar o rendimento e/ou favorecer características como gerar sólidos cristalinos, se caracterizando como um parâmetro crítico no processo sintético (ICH, 2016).

Conforme descrito em USA (2015), como os solventes residuais não possuem benefício terapêutico, é necessária sua remoção atendendo às especificações do produto, às políticas de boas práticas de fabricação ou outros requisitos baseados em qualidade. Na síntese de medicamentos, os principais processos para retirar os solventes são a secagem e a recristalização, porém, mesmo após estes processos, é possível a existência dos SR (GRODOWSKA; PARCZEWSKI, 2010).

Os SR são frequentemente analisados por meio de técnicas cromatográficas, tais como cromatografia em fase gasosa (CG) que são capazes de identificar e quantificar estes resíduos e para verificar se os níveis presentes estão de acordo com os limites estabelecidos na International Conference on Harmonisation (ICH), por meio do Guideline for Residual Solvents Q3C- R6 de 1997 (ICH, 2016). O referido documento ainda divide os solventes residuais em quatro classes, de acordo com sua toxicidade (GRODOWSKA; PARCZEWSKI,

2010). Para fins de classificação, os compêndios oficiais utilizam o termo exposição diária permitida (EDP), que é definido como a ingestão máxima admissível de solventes residuais provenientes de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2015).

2.3.1 Solventes residuais da Classe 1

Os solventes residuais da classe 1 não devem ser empregados na fabricação de IFAs, excipientes ou produtos acabados devido à sua toxicidade inaceitável, ou seus efeitos ambientais nocivos (BRASIL, 2015). No entanto, se o seu uso for inevitável para produzir um medicamento com um avanço terapêutico significativo, então seus níveis devem ser restritos conforme mostrado na Tabela 1, a menos que seja justificado de outra forma. O 1,1,1-tricloroetano, por exemplo, é considerado uma substância ambientalmente tóxica e seu limite (1500 ppm) é baseado em uma revisão dos dados de segurança (ICH, 2016).

Tabela 1 - Solventes residuais de classe 1 e respectivos limites de concentração

Solvente	Limite de concentração (ppm)	Motivo
Benzeno	2	Carcinogênico
Tetracloroeto de carbono	2	Tóxico e apresenta riscos ao ambiente
1,2-Dicloroetano	2	Tóxico
1,1-Dicloroetano	8	Tóxico
1,1,1-Tricloroetano	1500	Apresenta riscos ao ambiente

Fonte: ICH, 2016.

Quando solventes residuais classe 1 são usados ou produzidos no fabrico ou na purificação de uma substância, droga, excipiente, ou medicamento e não são removidos pelo processo, devem ser identificados e quantificados. Sempre que possível, os procedimentos a serem executados devem ser os recomendados pelos compêndios oficiais. Caso contrário, um procedimento validado adequado deve ser empregado (USA, 2015).

2.3.2 Solventes residuais da Classe 2

Os solventes residuais da classe 2 (Tabela 2; p. 9) devem ser limitados nos IFAs, excipientes e produtos acabados devido à sua toxicidade inerente. A EDP é fornecida como uma aproximação de 0,1 mg por dia e as concentrações com uma aproximação de 10 ppm. Os valores indicados não refletem precisão analítica necessária do processo de determinação, de

forma que a precisão deva ser determinada como parte da validação do experimento. Os métodos de identificação e quantificação dos solventes residuais da classe 2 devem ser de acordo com o recomendado pelos compêndios oficiais, ou validados de maneira adequada. Entre os SR da Classe 2, está o tolueno (BRASIL, 2015).

Tabela 2- Solventes residuais de classe 2 e os respectivos limites de concentração

Solvente	EDP (mg/dia)	Limite de concentração (ppm)
Acetonitrila	4,1	410
Ciclohexano	38,8	3880
Clorobenzeno	3,6	360
Clorofórmio	0,6	60
Cloreto de metileno	6,0	600
Cumeno	0,7	70
1,2 dicloroetano	18,7	1870
N,N-Dimetilacetamida	10,9	1090
N,N-Dimetilformamida	8,8	880
1,2-Dimetoxietano	1,0	100
1,4-Dioxano	3,8	380
Etilenoglicol	6,2	620
2-etoxietanol	1,6	160
Formamida	2,2	220
Hexano	2,9	290
Metanol	30,0	3000
Metilbutilcetona	0,5	50
Metilciclohexano	11,8	1180
N-Metilpirrolidona	5,3	530
2-Metoxietanol	0,5	50
Nitrometano	0,5	50
Piridina	2,0	200
Sulfolano	1,6	160
Tetrahidrofurano	7,2	720
Tetralina	1,0	100
Tolueno	8,9	890
Tricloroetileno	0,8	80
Xileno	21,7	2170

Fonte: ICH, 2016.

2.3.3 Solventes residuais da Classe 3

Considera-se que os solventes residuais da classe 3 (Quadro 2) são menos tóxicos e representam menores riscos à saúde humana, quando comparados com os solventes residuais das classes 1 e 2 (BRASIL, 2015). De fato, a Classe 3 não inclui solventes que representam um risco para a saúde humana aos níveis normalmente aceitos em produtos farmacêuticos, porém ainda não há estudos a longo prazo de toxicidade ou carcinogenicidade para muitos destes solventes. Dados disponíveis na literatura indicam que são menos tóxicos em estudos agudos ou de curto prazo e negativos em estudos de genotoxicidade (USA, 2015).

Quadro 2 - Solventes residuais de classe 3

Acetato de butila	Etan-1-ol
Acetato de etila	Éter terc-butil metílico
Acetato de isobutila	Éter etílico
Acetato de isopropila	Formiato de etila
Acetato de metila	Heptano
Acetato de propila	3-metilbutan-1-ol
Acetona	Metiletilcetona
Ácido acético	Metilisobutilcetona
Ácido fórmico	2-metilpropan-1-ol
Anisol	Pentano
Butan-1-ol	Pentan-1-ol
Butan-2-ol	Propan-1-ol
Dimetil sulfóxido	Propan-2-ol

Fonte: ICH, 2016.

Considera-se aceitável para os solventes residuais da Classe 3 a ingestão de até 50 mg por dia (5000 ppm). Se o limite do solvente da Classe 3, em uma monografia individual, for superior a 50 mg por dia, esse solvente residual deve ser identificado e quantificado por métodos recomendados pelos compêndios oficiais ou por métodos devidamente validados. Salienta-se que quantidades superiores podem ser aceitáveis, desde que autorizadas pelo órgão regulador competente, tendo em vista a capacidade do processo e as boas práticas de fabricação (BRASIL, 2015).

2.3.4 Solventes residuais da Classe 4

Os solventes residuais da classe 4 (Quadro 3) podem também ser de interesse para os fabricantes de IFAs, excipientes ou produtos acabados, mas até o momento não foram encontrados dados adequados para fundamentar a EDP. No entanto há uma preocupação com o potencial toxicológico dessas substâncias, motivo pelo qual os fabricantes devem fornecer aos órgãos competentes a justificativa do uso, dados seus níveis residuais em produtos farmacêuticos (ICH, 2016).

Quadro 3 – Solventes residuais de Classe 4

Ácido tricloroacético	Éter isopropílico
Ácido trifluoroacético	Éter de petróleo
1,1-Dietoxipropano	Isocetano
1,1-Dimetoximetano	Metil isopropil cetona
2,2-Dimetoxipropano	Metiltetrahidrofurano

Fonte: ICH, 2016.

2.4 Validação analítica

Várias definições estão descritas na literatura para validação, sendo que, determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com alguns pré-requisitos estabelecidos (BRITO *et al.*, 2003). Para o presente trabalho considerará o termo “validação analítica”, que em Brasil (2017) é definido como sendo a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu pretendido uso sejam atendidos.

Para Skoog *et al.* (2006), a validação determina a adequação de uma análise no sentido de fornecer a informação desejada, sendo que os métodos mais comuns de validação incluem a análise de materiais padrão de referência quando disponíveis, a análise por um método analítico diferente, a análise de amostras fortificadas e a análise de amostras sintéticas que têm composição química próxima da amostra real.

Em Brasil (2017), é descrito que na validação de métodos analíticos deverá ser utilizada como padrão de análise uma Substância Química de Referência (SQR) definida como uma substância ou mistura de substâncias químicas ou biológicas com alto grau de pureza, cuidadosamente caracterizada para assegurar sua identidade, qualidade, teor e potência incluindo-se Substância Química de Referência Farmacopeica (SQF) e Substância Química de Referência Caracterizada (SQC).

Considera-se como SQF a substância ou mistura de substâncias químicas ou biológicas, estabelecida e distribuída por compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA. Define-se como SQC uma substância ou mistura de substâncias químicas ou biológicas em que a identidade, a qualidade, a pureza, o teor e a potência tenham sido assegurados por um processo de caracterização (BRASIL, 2010).

Sempre que possível em uma validação analítica recomenda-se o uso de uma SQF, no entanto o uso de uma SQC é admitido mediante a apresentação de relatório de caracterização conclusivo para o lote em estudo, que contenha dados obtidos a partir de técnicas aplicáveis à caracterização da substância química. São exemplos destas técnicas, a espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, análise elementar (carbono/hidrogênio/nitrogênio), difração de raio X, métodos cromatográficos, entre outras (BRASIL, 2017).

A utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela ANVISA requer a realização de uma validação analítica, conforme parâmetros estabelecidos pela agência reguladora em questão, levando-se em consideração as condições técnico-operacionais. Os parâmetros típicos a serem considerados para a validação dependem do ensaio a ser realizado e estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros considerados para a validação analítica

Parâmetro	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim*
Precisão intermediária	Não	Sim*	Não	Sim*
Seletividade**	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não***	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não***
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

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

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

***Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: BRASIL, 2017.

2.4.1 Seletividade

Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2017). Desta forma a seletividade pode ser definida como a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Dentre os interferentes pode-se destacar, isômeros, produtos de degradação, impurezas, dentre outras substâncias quimicamente relacionadas com o analito (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A realização do teste de seletividade durante uma validação analítica é de suma importância, já que, a medição realizada pelo equipamento pode ser diferente da medição esperada, pois, reagentes, matriz da amostra ou outros componentes podem alterar a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo, mas, uma vez conhecidos, estes problemas podem ser superados por meio de adição de padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção (INMETRO, 2017).

Observa-se em BRASIL (2017), que a seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente frente a substâncias estruturalmente semelhantes a este, sendo o critério de aceitação, a obtenção de resultado negativo.

INMETRO (2017) descreve que, normalmente, parte-se da hipótese de que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa, desta forma para realização do ensaio de seletividade, preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse.

2.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida a priori. Sendo assim a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (RIBANI *et al.*, 2004).

Nota-se em INMETRO (2017), que a linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Na padronização externa comparam-se a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Já a padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno (RIBANI *et al.*, 2004).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração do analito;

a = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular da reta);

b = coeficiente linear da reta.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear (INMETRO, 2017). A regressão linear consiste em uma linha de regressão que ajuste melhor aos dados obtidos, e esse ajuste se dá com base nos parâmetros “a” e “b” da equação 1, quando obtidos de forma a minimizar a soma dos quadrados dos desvios verticais. Por esta razão este cálculo é chamado de “método dos mínimos quadrados” (MONTGOMERY, 2009).

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. O parâmetro “r” permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

Na realização do teste de linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da SQR para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata, sendo que estas devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR. Todos os cálculos para a avaliação da linearidade devem ser realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais (BRASIL, 2017).

Para termos de aceitação do teste de linearidade, a ANVISA define os dados que devem ser apresentados tais quais: representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, gráfico de dispersão dos resíduos, equação da reta de regressão de y em x , avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), bem como da significância do coeficiente angular. Além dos dados anteriormente citados deve-se investigar a homoscedasticidade de forma a utilizar um modelo mais adequado ao método e utilizar níveis de significância de 5% para os testes estatísticos. No que diz respeito a equação da reta é exigido um coeficiente de correlação maior que 0,990 e coeficiente angular diferente de 0 (zero) (BRASIL, 2017).

2.4.3 Precisão

A precisão descreve a reprodutibilidade de medidas, ou seja, a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (SKOOG *et al.*, 2006).

De acordo com INMETRO (2017) a precisão de um método é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão. Conforme visto em BRASIL (2017), acrescenta-se que além desses dois parâmetros, pode-se determinar a precisão de um método utilizando-se também a precisão intermediária.

A repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios, expressa a precisão nas mesmas condições de operação como, equipamento, analista, reagentes, dia, mesmas condições ambientais, reproduzidos em pequeno espaço de tempo (BRITO *et al.*, 2003). Na determinação desse parâmetro deve-se utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, no intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas (BRASIL, 2017).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição, executada inclusive por diferentes laboratórios e por isso importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos (INMETRO, 2017). Justamente por surgir como resultado de análise de precisão entre laboratórios distintos, a reprodutibilidade é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos

analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados (BRASIL, 2017).

A precisão intermediária indica o efeito das variações em um laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (RIBANI *et al.*, 2004). Nota-se em INMETRO (2017), que esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, portanto a mais aconselhável de se usar.

Conforme mostrado em BRASIL (2017), a precisão intermediária deve expressar os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, com operadores distintos e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetitividade.

2.4.4 Exatidão

A exatidão indica a proximidade da medida do valor verdadeiro, ou aceito, e é expressa em termos de erro absoluto e erro relativo, ou seja, representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (SKOOG *et al.*, 2006; RIBANI *et al.*, 2004).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO 2017).

A exatidão deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo comparando-se com um valor aceito como verdadeiro e verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações que contemplem o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (BRASIL, 2017).

2.4.5 Limite de Detecção

Ribeiro *et al.* (2008) definem o limite de detecção (LD) como a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental. Em termos de confiabilidade, INMETRO (2017) descreve que o limite de detecção deve expressar a concentração mínima da substância medida com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio do método visual, razão sinal/ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (BRASIL, 2017).

Nos métodos visuais utiliza-se a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de forma que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico a visualização da menor concentração visível detectável, inclusive por métodos de integração (RIBANI *et al.*, 2004).

Para os métodos que utilizam curva analítica, o LD pode ser definido como a concentração analítica que produz uma resposta a um determinado fator de confiança superior ao desvio padrão do branco (SKOOG *et al.*, 2006). A determinação do LD é realizada por meio do seguinte cálculo:

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

Onde:

IC = inclinação da curva de calibração

σ = desvio-padrão populacional.

O método da relação sinal-ruído é aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base por meio da comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco. A razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1 (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a mais baixa concentração do analito que possa ser quantificada com precisão e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório, em condições normais (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O método mais comum para determinação do LQ é o método sinal ruído, mas em se tratando de técnicas cromatográficas esse método pode não ser o ideal, tendo em vista que a curva analítica é construída não só com o sinal do detector, mas também com a área da

amostra, ou seja, dificultando assim medição do ruído. Nesses casos recomenda-se a utilização do método baseados em parâmetros da curva analítica, por este apresentar dados estatísticos mais confiáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

Observa-se em BRASIL (2017), que o LQ pode ser determinado utilizando o método visual, a relação sinal/ruído (10:1), ou pelo método analítico pela relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica, em níveis próximos ao LQ, a partir da equação:

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

Onde:

IC = inclinação da curva de calibração

σ = o desvio-padrão populacional.

A medida que se decrece o nível de concentração do LQ aumenta-se o erro da medida tornando-a menos precisa. Portanto nada impede de determina-se um LQ maior para um método tendo em vista conferir a este maior confiabilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.7 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta perante pequenas variações, sendo assim um método é considerado robusto se for praticamente insensível às pequenas variações que possam ocorrer quando esse for executado (PASCHOAL *et al.*, 2008).

BRASIL (2017) afirma que no caso de métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos, deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Já nos métodos qualitativos, deve ser verificado se as variações propostas interferem na resposta analítica. No Quadro 4 (p. 19) são mostrados os parâmetros recomendados para a avaliar a robustez de um método de acordo com a etapa e técnica utilizada.

Para determinar o parâmetro em questão, percebe-se em INMETRO (2017) a recomendação do teste de *Youden*, que além de avaliar a robustez do método, permite também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando desta forma qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Neste teste são realizados oito ensaios

com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação destes que apresentam variações (RIBANI *et al.*, 2004).

Quadro 4 – Condições para avaliação da robustez de um método

Preparo de amostras	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	Variação do pH da solução Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel Variação na composição da fase móvel Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
Cromatografia gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura Velocidade do gás de arraste
Outras técnicas analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados

Fonte: BRASIL, 2017.

Se o resultado do teste de robustez for satisfatório para as variáveis analisadas, estas podem inclusive ser incorporadas no procedimento. Salienta-se que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionado à sua precisão (INMETRO 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

2.5 Cromatografia a gás

Cromatografia é um termo utilizado para designar diversos sistemas e técnicas e está baseada na repartição de uma solução entre duas fases, chamadas de fase estacionária e fase móvel (NETO; NUNES, 2003). Os primeiros artigos publicados que se referem à cromatografia como ciência, relatam a separação de substâncias de extratos de plantas e foram publicados em 1906 pelo botânico russo Michael Tswett (VON MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

A cromatografia tem aplicabilidade nas mais diversas áreas e permite separar e quantificar inclusive substâncias com características físico-químicas semelhantes e misturas complexas (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008). Segundo Skoog *et al.* (2006), nenhum outro método de separação é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia.

Desde o seu surgimento a cromatografia desenvolveu-se atingindo o patamar de técnica instrumental, tendo como uma das mais importantes a cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa é uma técnica com alto poder de resolução, o que torna possível, por

exemplo, a análise de dezenas de substâncias em uma mesma amostra. O uso bastante acentuado desta técnica se deve também aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos ((PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008; VON MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

A técnica de desenvolvimento utilizada em cromatografia gasosa é a eluição, processo pelo qual os solutos são eluídos através da fase estacionária pelo movimento de uma fase móvel (gás de arraste). O eluato é a fase móvel que deixa a coluna, e denomina-se como eluente qualquer solvente empregado para transportar os componentes de uma mistura através de uma fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG *et al.*, 2006).

A coluna cromatográfica consiste de um tubo longo e estreito que pode ser de cobre, aço inoxidável, alumínio, vidro, sílica fundida, etc. Este tubo é recheado por um suporte inerte que retém a fase estacionária na superfície (NETO; NUNES, 2003). O processo que ocorre dentro da coluna consiste na introdução da solução da amostra na fase móvel, de forma que os componentes da mistura se distribuam entre esta fase e a fase estacionária de acordo com a afinidade química por uma ou por outra (SKOOG *et al.*, 2006).

Collins, Braga e Bonato (2006), afirmam que a eficiência de uma coluna cromatográfica é medida pela quantidade de pratos teóricos que esta possui. Um prato teórico pode ser definido como sendo uma etapa de equilíbrio de uma substância entre as fases estacionária e móvel sendo que, o número de pratos considerando uma única coluna pode ser definido como segue:

$$N = 16 \left(\frac{dr}{Wb} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: N = número de pratos teóricos,

dr =distância de retenção

Wb = largura do pico na linha de base

Quando se deseja comparar a eficiência de diferentes colunas pode-se relacionar a altura de prato (H) com o número de pratos teóricos (N), da seguinte maneira:

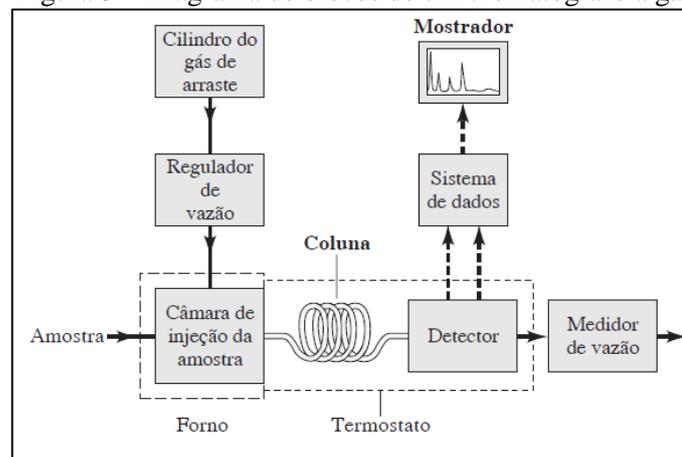
$$N = \left(\frac{L}{H} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

Onde, L corresponde ao comprimento da coluna, sendo possível perceber que a eficiência cromatográfica aumenta à medida que altura do prato H torna-se menor e/ou o comprimento L torna-se maior (SKOOG *et al.*, 2006).

O processo geral de cromatografia gasosa pode ser resumido como a introdução da amostra na câmara de injeção (com o auxílio de uma seringa), em que a referida amostra é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste para a coluna cromatográfica, situada dentro de um forno pré-aquecido. Os componentes da amostra são separados por eluição e direcionados ao detector conectado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

Na Figura 3 é possível visualizar o processo descrito.

Figura 3 – Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás



Fonte: SKOOG *et al.*, 2006.

O processo de detecção da amostra pode ser estudado à parte, tendo em vista a grande importância para a análise, bem como a gama de detectores possíveis de serem empregados. Ao escolher o detector ideal, deve-se levar em consideração características, tais como: seletividade, sensibilidade, proximidade entre valores de ruído estático e dinâmico, limite de detecção, linearidade, insensibilidade a alterações de vazão e temperatura e resistência às condições de trabalho (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Na Tabela 4 (p. 22) são mostrados os detectores mais comumente utilizados.

As substâncias separadas e registradas pelo detector emitem um sinal para um sistema de registro e tratamento de dados, que dão origem, por conseguinte, a um cromatograma. O cromatograma é considerado ideal se os picos se apresentarem separados e simétricos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Skoog *et al.* (2006), por sua vez, definem um

cromatograma como sendo um gráfico de alguma função da concentração do soluto versus o tempo de eluição ou volume de eluição, sendo útil para análises qualitativas e quantitativas.

Tabela 4 – Detectores para cromatografia gasosa

Tipo de detector	Amostras a que são aplicáveis	Limite de detecção típico
Ionização em chama	Hidrocarbonetos	0,2 pg s ⁻¹
Condutividade térmica	Detector universal	500 pg mL ⁻¹
Captura de elétrons	Compostos halogenados	5 fg s ⁻¹ C
Espectrômetro de massas	Ajustável a qualquer espécie	0,25 – 100 pg
Termiônico	Compostos de fósforo e	0,1 pg s ⁻¹ (P)
	Nitrogênio	1 pg s ⁻¹ (N)
Condutividade eletrolítica (Hall)	Compostos halogenados enxofre ou nitrogênio	0,5 pg s ⁻¹ (Cl)
		2 pg s ⁻¹ S
		4 pg s ⁻¹ N
Fotoionização	Compostos ionizáveis por radiação UV	2 pg s ⁻¹ C
Infravermelho com transformada de Fourier	Compostos orgânicos	0,2 – 40 mg

Fonte: SKOOG *et al.*, 2006.

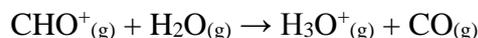
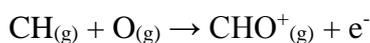
Nos procedimentos inerentes a este trabalho utilizou-se o detector por ionização em chama (DIC) e espectrômetro de massas (EM), portanto estes serão explicados com mais detalhes na presente revisão.

2.5.1 Cromatografia gasosa por ionização de chama

O detector por ionização em chama é um equipamento robusto e de simples operação, com alto nível de detectabilidade e resposta quase que universal para as substâncias em geral. Além das características anteriormente citadas destaca-se ainda a respeito do DIC vantagens como: ampla faixa de linearidade e baixo ruído, razões que tornaram o detector em questão um dos mais utilizados em cromatografia gasosa. (HIGSON, 2009; VISENTAINER, 2012).

O efluente da coluna quando chega ao DIC é direcionado a uma chama abastecida com ar sintético e gás hidrogênio. Como a maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolisados neste tipo de chama, a detecção ocorre pelo monitoramento da corrente produzida após a coleta dessas espécies carregadas (SKOOG *et al.*, 2006).

Visentainer (2012) evidencia as reações genéricas que ocorrem no DIC, mostradas a seguir:



Conforme mostrado nas equações anteriores, quando em contato com a chama as substâncias orgânicas direcionadas ao DIC reagem para formar o cátion formila (CHO^+) que, devido à sua instabilidade, reage rapidamente com água para gerar o cátion hidrônio. Desta forma a magnitude do sinal gerado é proporcional aos átomos de carbonos ligados a átomos de hidrogênios na molécula, ou seja, os carbonos ativos (C^*) (VISENTAINER, 2012).

O DIC responde satisfatoriamente a quase todos os compostos, exceto aqueles que produzem pouco ou nenhum íon na chama, como por exemplo: álcoois e os compostos carbonílicos, halogênicos e amínicos. Este detector não evidencia sinais de gases não combustíveis como gás carbônico (CO_2), dióxido de enxofre (SO_2) e óxidos de nitrogênio (NO_x), e é pouco sensível ao dissulfeto de carbono (CS_2) e água, razão pela qual estes últimos podem inclusive ser utilizados como solventes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG *et al.*, 2006).

A quantidade mínima detectável do DIC é de aproximadamente 10^{-12} g (alcanos) e sua eficiência está relacionada com a razão das vazões dos gases que alimentam a chama. Em geral, uma proporção de 1:1:10 para o gás de arraste, gás hidrogênio e ar comprimido respectivamente, tem gerado bons resultados no que diz respeito à detectabilidade e estabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.5.2 Cromatografia gasosa por espectrometria de massas (CGEM)

O acoplamento de um cromatógrafo gasoso a um detector como o espectrômetro de massas (EM) é bastante útil, pois combina a alta seletividade e eficiência de separação da técnica cromatográfica com as informações específicas cedidas pela espectrometria de massas, tais como: informação estrutural e massa molecular (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Solomons e Fryhle (2012) relatam que a espectrometria de massas envolve a formação de íons da amostra de interesse, e a separação e detecção destes de acordo com sua massa e carga. Este processo gera um espectro da abundância relativa destes íons em função da razão entre a massa e a carga (m/z) correspondente, ao qual se denomina espectro de massas.

Ao ser direcionada do CG para o detector em questão, a amostra – que até então se encontra em pressão atmosférica – é submetida a um sistema de vácuo que a adequa ao ambiente de baixa pressão do EM. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra são submetidas a uma fonte de ionização gerando desta forma os íons característicos. Os métodos de ionização mais empregados em CGEM são os de ionização por impacto de elétrons (IE) e ionização química (IQ), justamente pelo estado físico em que a amostra se encontra (SKOOG *et al.*, 2006).

Na ionização por impacto de elétrons a amostra em fase gasosa é “bombardeada” por um feixe de elétrons de 70 eV. Esta técnica é bastante agressiva e promove uma fragmentação significativa da amostra, o que muitas vezes impede a formação do íon molécula (analito ionizado pela remoção de 1 elétron, representado como M^+) já que a energia requerida para a formação dessa espécie é de aproximadamente 10 eV. Esta é uma das desvantagens do IE, justamente por algumas vezes ocasionar a perda de uma das mais importantes informações na fragmentação de uma espécie (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Na IQ as moléculas do analito são direcionadas à câmara de ionização e misturadas com um gás reagente. A mistura contém excesso do referido gás em relação ao analito na ordem de 1000:1, desta forma quando esta mistura é submetida ao impacto de elétrons, ocorre ionização quase que totalmente do gás, sendo que as moléculas do gás ionizado reagem com as moléculas neutras do analito formando íons “pseudomoleculares” ($M+H^+$). Este processo é relativamente de baixa energia e por isso não há uma fragmentação em massa das moléculas do analito, ou seja, a técnica de IQ é útil especialmente para aumentar a produção do íon molecular (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os íons moleculares bem como os demais fragmentos de moléculas do analito após saírem da fonte de ionização, são direcionados a um analisador que separa os íons de acordo com seus valores de m/z , e descarta as moléculas neutras. As espécies carregadas são enviadas para a superfície de um detector sendo que neste processo ocorre uma colisão e consequente emissão de elétrons, fótons ou outros íons. O processo de detecção ocorre justamente pela identificação destes produtos de colisão que podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. São exemplos de detectores convencionais, os multiplicadores de elétrons, quadrupolos, íons *trap*, entre outros (SKOOG *et al.*, 2006).

Após a detecção, as espécies de interesse são enviadas para um sistema de dados que as analisa considerando a abundância de íons em função do tempo gerando assim um

cromatograma total de íons, ou considerando um tempo particular, identificando assim os compostos que estão eluindo neste momento e gerando um espectro de massas. A análise pode também ser feita gerando-se um espectro de massas de um composto de interesse selecionando seu valor de m/z , técnica a qual dá-se o nome de monitoramento do íon selecionado (SKOOG *et al.*, 2006).

Por fim, tendo em mãos as informações do espectro de massas (íon molecular, pico base e os padrões de fragmentação), é possível utilizá-las na caracterização estrutural do analito (PAVIA *et al.*, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para realização dos testes referentes a validação do método em questão, utilizou-se como amostra o soro hiperimune, lote LFS 1507-09, produzido pela Fundação Ezequiel Dias.

3.2 Reagentes e Solventes

Foram utilizados os seguintes solventes: a) tolueno para análise (PA), marca PanReac AppliChem ITW Reagents, lote 0000865880, fabricado em 20 de junho de 2016 e válido até junho de 2022; b) acetona PA, marca Sigma-Aldrich, lote DCBC6839V, fabricado em 1 de agosto de 2014 e válido até 01 de outubro de 2022; c) dimetilsulfóxido (DMSO) PA, marca Honeywell, fabricado em 25 de abril de 2017 e válido até 09 de abril de 2020 e d) hexano PA, marca Vetec, fabricado em 19 de maio de 2014 e válido até 19 de maio de 2022.

3.3 Método a ser validado

No presente trabalho realizou-se a validação de metodologia para determinação do solvente residual tolueno nos soros produzidos pela FUNED. As condições do método analítico a ser validado estão descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Parâmetros da análise cromatográfica da amostra de solvente residual

Item	Condição
Coluna cromatográfica	Coluna de sílica fundida de 0,32 mm x 30 m revestida com uma camada de 1,8 µm de fase 6% cianopropilfenil e 94% dimetilpolisiloxano
Fase móvel	Gás hélio (He)
Modo de controle de fluxo	Velocidade linear
Pressão	101,1 kPa
Razão de Split	1:5
Gradiente de forno de coluna	Temperatura inicial de 40°C, com aquecimento a 20°C/min até 240°C. Por fim, 240°C por 5 min.
Temperatura do injetor	150°C
Modo de injeção	Headspace
Detector	Ionização de chama
Tempo de incubação	30 min
Temperatura de incubação	105°C
Temperatura da seringa	100°C
Volume de injeção	1,0 ml

Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2018.

Realizaram-se todas análises referentes a este procedimento no Serviço de Controle Físico-Químico da FUNED, conforme proposto por Fundação Ezequiel Dias, (2018).

3.4 Procedimentos

3.4.1 Caracterização do tolueno

A SQC utilizada no presente trabalho foi obtida por meio da caracterização do tolueno PA anteriormente citado, quando realizaram-se os ensaios de espectroscopia de UV-Vis e IV, espectrometria de massas e determinação do teor de umidade.

3.4.1.1 Espectroscopia na região do ultravioleta e do visível

Pipetou-se com micropipeta de volume variável 0,001 mL do tolueno a ser caracterizado, transferindo-o para um balão volumétrico de 100 mL, o qual continha aproximadamente cerca de 50 mL de hexano PA. A solução foi homogeneizada orbitalmente e logo após completou-se o volume do balão volumétrico com hexano PA até o menisco volumétrico, tampando-o e homogeneizando-o.

Utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV Probe 400, para a análise da solução 0,001 % v/v, realizando uma “varredura espectral” entre 1100 e 190 nm. Para a realização da análise em questão ligou-se o equipamento cerca de 30 minutos antes da utilização e, em seguida, realizou-se em cubeta de quartzo a leitura do hexano PA, obtendo-se, assim, a referência de análise (branco) ou *baseline*, nos casos de varredura espectral. Em seguida, realizou-se a leitura da amostra e os dados obtidos foram exportados para o programa Excel® para o processamento do espectro.

3.4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho

A análise de infravermelho foi realizada em um equipamento Shimadzu - IR Prestige 21, com acessório de leitura de líquidos na faixa de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , sendo utilizados 40 *scans*. O espectro foi obtido com resolução de 1 cm^{-1} .

3.4.1.3. Espectrometria de Massas

Adicionou-se em um *vial* para injeção de líquidos 2 mL do tolueno a ser caracterizado.

Injetou-se a solução anterior no cromatógrafo Shimadzu QP 2010 Ultra, realizando a análise com o método descrito no Quadro 6 (p. 28).

Quadro 6 - Método cromatográfico utilizado na caracterização do tolueno

Item	Condição
Coluna cromatográfica	Coluna de sílica fundida de 0,32 mm x 30 m revestida com uma camada de 1,8 µm de fase 6% cianopropilfenil e 94% dimetilpolisiloxano
Fase móvel	Gás hélio (He)
Modo de controle de fluxo	Velocidade linear
Pressão	142,1 kPa
Razão de Split	1:250
Gradiente de forno de coluna	Temperatura inicial de 40°C mantida durante 8 minutos, com aquecimento posterior a 10°C/min até 150°C, mantida 3 minutos. Por fim, aquecimento a 20°C/min até 240°C.
Temperatura do injetor	140°C
Modo de injeção	Injeção de líquidos
Tempo de incubação	30 min
Temperatura de incubação	105°C
Temperatura da seringa	100°C
Volume de injeção	1,0 µL
Detector	Espectrômetro de massas
Intervalo de análise em modo scan	29 a 300 m/z

Fonte: autoria própria.

3.4.2 Determinação do teor da SQC

A quantificação do teor de tolueno na SQC foi realizada conforme descrito em ACS (2016), quando procedeu-se com a análise via cromatografia gasosa de 7 replicatas do analito nas condições mostradas no Quadro 7.

Quadro 7 - Método cromatográfico utilizado na quantificação do tolueno

Item	Condição
Coluna cromatográfica	Coluna de sílica fundida de 0,32 mm x 30 m revestida com uma camada de 1,8 µm de fase 6% cianopropilfenil e 94% dimetilpolisiloxano
Fase móvel	Gás hélio (He)
Modo de controle de fluxo	Velocidade linear
Pressão	81 kPa
Razão de Split	1:5
Gradiente de forno de coluna	Temperatura inicial de 40°C mantida durante 5 minutos, com aquecimento posterior a 10°C/min até 220oC, mantida 2 minutos.
Temperatura do injetor	140°C
Modo de injeção	Injeção de líquidos
Tempo de incubação	30 min
Temperatura de incubação	105°C
Temperatura da seringa	100°C
Volume de injeção	1,0 µL
Detector	DIC

Fonte: autoria própria

Além de determinar o teor de tolueno do reagente PA, foi determinado também o teor de água contido nesse por meio da técnica de Karl Fischer Coulométrico. Para tanto prepararam-se 7 replicatas com cerca de 2,5 mg do tolueno PA em *vials* de 7 mL, previamente tarados em balança analítica, acoplando-os no analisador de umidade Karl Fischer Metrhon 831 KF Coulometer.

Após a obtenção dos resultados dos testes quantitativos anteriormente citados determinou-se o teor final da SQC.

3.4.3 Validação analítica

3.4.3.1 Seletividade

a. Preparo de soluções

1. *Solução estoque do padrão interno de acetona*

Adicionou-se em um balão volumétrico de 100 mL cerca de 75 mL de água ultrapura. Em seguida, adicionou-se com micropipeta de volume variável 250 μL de acetona PA homogeneizando-o orbitalmente. O balão foi completado com água ultrapura até o menisco volumétrico, homogeneizando-o novamente. Desta forma, obteve-se uma solução de acetona de concentração igual a $1,98 \text{ mg mL}^{-1}$, considerando a densidade da acetona como $0,791 \text{ g mL}^{-1}$.

2. *Solução padrão estoque de tolueno*

Adicionou-se DMSO em um balão volumétrico de 25 mL até próximo ao menisco, tampando o balão, medindo sua massa em balança analítica e anotando o valor obtido. Adicionou-se, com auxílio de micropipeta de volume variável, 45 μL de tolueno, medindo novamente a massa do balão e completando o volume deste com DMSO, até o menisco volumétrico. Por cálculo gravimétrico determinou-se a concentração final desta solução como sendo $1,57 \text{ mg mL}^{-1}$ de tolueno, considerando que a densidade deste reagente é de $0,87 \text{ g mL}^{-1}$.

3. *Solução 3 de tolueno*

Pipetou-se em um balão volumétrico de 100 mL, 3,0 mL da solução padrão estoque de tolueno, utilizando-se micropipeta de volume variável. Homogeneizou-se a mistura orbitalmente e, em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico com água ultrapura até o menisco, gerando, ao final, a “solução 3 de tolueno”.

4. Solução de tolueno $7,83 \mu\text{g mL}^{-1}$

Pipetou-se com micropipeta de volume variável 1 mL da solução de 3 tolueno (p. 29) transferindo-se para um *vial* de 20 mL. Utilizando-se a mesma micropipeta, porém com novas ponteiros, adicionou-se ao *vial* 5 mL de água ultrapura. Fechou-se o *vial* hermeticamente homogeneizando-o.

5. Solução padrão de acetona

Adicionou-se em um *vial* de 20 mL, com micropipeta de volume variável, 5 mL de água ultrapura e, trocando-se a ponteira, 1 mL da solução estoque do padrão interno de acetona (item 1; p. 29). Fechou-se o *vial* hermeticamente, homogeneizando-o em seguida, obtendo uma solução de acetona de concentração igual a $330 \mu\text{g mL}^{-1}$.

6. Solução padrão combinada de tolueno e acetona

Adicionou-se em um *vial* de 20 mL, 4,0 mL de água ultrapura por meio de micropipeta de volume variável e, em seguida, com a mesma pipeta e novas ponteiros, 1,0 mL da solução 3 de tolueno (item 3; p. 29) e 1,0 mL da solução estoque do padrão interno de acetona (item 1; p. 29), fechando hermeticamente e homogeneizando-o. Neste *vial* obteve-se uma solução com concentração de tolueno igual a $7,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de acetona igual a $330 \mu\text{g mL}^{-1}$.

7. Solução estoque de soro

Mediu-se 1,25121 g de soro hiperimune em balão volumétrico de 25 mL, previamente tarado em balança analítica homogeneizando-o orbitalmente. Completou-se o balão com água ultrapura até a altura do menisco volumétrico e, em seguida, o balão volumétrico foi tampado e homogeneizado mais uma vez.

8. Solução problema

Pipetou-se com micropipeta de volume variável 1,0 mL da solução estoque de soro anteriormente preparada, transferindo-a para um *vial* de 20 mL. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de água ultrapura no *vial* utilizando-se a mesma micropipeta com uma nova ponteira. Por fim, o *vial* foi fechado hermeticamente.

9. Solução problema fortificada

Pipetou-se com uma micropipeta de volume variável 1 mL da solução estoque de soro anteriormente preparada, adicionando-a em um *vial* de 20 mL. Utilizando a mesma

micropipeta, com novas ponteiros, adicionou-se no mesmo *vial*, 1 mL da solução 3 de tolueno (item 3; p. 29), 1 mL da solução estoque do padrão interno de acetona (item 1; p. 29) e 3,0 mL de água ultrapura. Fechou-se o *vial* hermeticamente, homogeneizando-o em seguida.

b. Procedimento de análise

As soluções preparadas para o testes de seletividade foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás Shimadzu QP 2010 Ultra conforme as condições experimentais descritas no Quadro 5 (p. 26).

3.4.3.2 Linearidade

a. Curva usual

Preparou-se soluções padrão secundárias pipetando – se para balões volumétricos de 100 mL quantidades específicas de solução padrão estoque de tolueno preparada conforme o item 2 (p. 29), obtendo-se as soluções descritas na Tabela 5. Para o preparo das referidas soluções utilizou-se de um mesmo micropipetador de volume variável (faixa de 1000 a 5000 μL), utilizando-se ponteiros diferentes para cada solução.

Tabela 5 - Preparo de soluções padrões intermediárias para o teste de linearidade

Solução padrão secundária	Volume utilizado de solução padrão de tolueno (mL)	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	1	15,7
2	2	31,4
3	3	47,1
4	4	62,8
5	5	78,5

Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2018.

Após o preparo das soluções anteriores procedeu-se com as diluições necessárias para obter no *vial* de análise as concentrações de interesse para a curva de calibração. Para tanto utilizou-se de um mesmo micropipetador de volume variável (faixa de 100 a 1000 μL), trocando-se as ponteiros quando necessário. Em todas as amostras foi adicionado 1,0 mL de padrão interno de acetona preparada conforme item 1 (p. 29) e 4,0 mL de água ultrapura. Ao final em cada *vial* obteve-se 6,0 mL de solução contendo 330 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acetona bem como tolueno nas concentrações teóricas mostradas na Tabela 6 (p. 32).

Tabela 6 - Níveis de concentração da curva usual

Nível	Solução padrão secundária utilizada (volume de 1 mL)	Concentração final de tolueno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	1	2,67
2	2	5,23
3	3	7,85
4	4	10,5
5	5	13,1

Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2018.

Realizou-se a análise cromatográfica das amostras utilizando das condições mostradas no Quadro 5 (p.26). Como o teste de linearidade foi realizado em quintuplicata, preparou-se de forma independente para cada curva as soluções mostradas nas Tabelas 5 e 6.

b. Curva matrizada

Para a análise de linearidade da curva matrizada preparam-se soluções padrão secundárias nas mesmas condições mostradas na tabela 5 (p. 32), além de 50 mL de solução estoque de soro preparada nas mesmas proporções descritas no item 7 (p. 30). Em cada *vial* de análise foram adicionados 1 mL de solução padrão interno de acetona preparada conforme item 1 (p. 29), 1 mL da solução estoque de soro, além de 1 mL das soluções padrões internas e dos volumes de água mostrados na Tabela 7. Assim obteve-se em cada *vial* 6,0 mL de solução com concentração final de acetona igual a $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ e concentrações de tolueno mostradas na mesma Tabela 7.

Tabela 7- Níveis de concentração da curva matrizada

Nível	Solução padrão secundária utilizada (volume de 1 mL)	Volume de água (mL)	Concentração final de tolueno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	-	4	0
1	1	3	2,67
2	2	3	5,23
3	3	3	7,85
4	4	3	10,5
5	5	3	13,1

Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2018.

Assim como na curva usual procedeu-se com a análise de linearidade da curva matricizada em quintuplicata de dados utilizando-se das mesmas condições mostradas no 5 (p.26).

c. Análise estatística

Após obtenção dos cromatogramas referentes às curvas usual e matricizada, procedeu-se com o tratamento estatístico dos dados utilizando o *software R* (versão 3.4.3). O tratamento foi composto pelos testes de resíduo padronizado de *Jackknife*, normalidade de resíduos de *Ryan-Joiner*, interdependência de resíduos de *Durbin-Watson*, homocedasticidade de resíduos de *Brown-Forsythe* e testes de adequação ao modelo linear (ANOVA).

3.4.3.3 Precisão e exatidão

Para realização dos parâmetros de exatidão e precisão, realizaram-se no laboratório do SCFQ o preparo de uma curva usual, com soluções de tolueno nas concentrações de 2,61, 5,22, 7,83, 10,4 e 13,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e de outras seis replicatas dos níveis 1, 3 e 5 desta curva, totalizando, assim, 23 *vials* com as referidas soluções. O preparo da curva, bem como das replicatas, foi realizado da mesma maneira descrita para o teste de linearidade (p. 31).

O procedimento em questão foi realizado de forma a atestar a precisão intermediária do método conforme o Quadro 8.

Quadro 8 - Realização dos testes de exatidão e precisão

Dia de análise	Responsável pelo procedimento	Equipamento
Dia 1	Analista 1	Cromatógrafo SCFQ
Dia 2	Analista 2	Cromatógrafo SCFQ

Fonte: autoria própria

As amostras preparadas foram analisadas conforme método descrito no Quadro 5 (p. 26) e, após a obtenção dos resultados, procedeu-se com os cálculos de ANOVA utilizando-se do *software R* (versão 3.4.3).

3.4.3.4 Robustez

O parâmetro robustez foi avaliado através do teste de *Younden Steiner*, quando foram avaliadas sete variáveis do método através de oito análises de cada amostra, conforme os Quadros 9 e 10 (p. 34)

Quadro 9 - Distribuição de variáveis para o teste de *Youden Steiner*

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

Fonte: Adaptado de INMETRO, 2017.

Para o trabalho em questão, foram consideradas as variáveis não codificadas descritas no Quadro 10.

Quadro 10 - Variáveis para teste de robustez

	Variável	Limites inferior e superior
A	Tempo de incubação	a: 25 min A: 35 min
B	Temperatura de incubação	b: 100 °C B: 110 °C
C	Taxa de Split	c: 2 C: 10
D	Temperatura do injetor	d: 130 °C D: 180 °C
E	Temperatura da seringa	e: 100 °C E: 110 °C
F	Pipetagem da água	f: Pipetador automático F: Pipetador HandyStep®
G	Detector	g: DIC G: Massas

Fonte: FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2018.

Após a organização das variáveis, foram determinadas as condições de análises para a avaliação da robustez conforme descritas no Quadro 11 (p. 35) em que cada coluna representa uma condição de análise distinta compostas pelas variáveis anteriormente determinados.

Quadro 11 - Condições de análise do teste de robustez.

1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de incubação: 35 min	Tempo de incubação: 25 min						
Temperatura de incubação: 110 °C	Temperatura de incubação: 110 °C	Temperatura de incubação: 100 °C	Temperatura de incubação: 100 °C	Temperatura de incubação: 110 °C	Temperatura de incubação: 110 °C	Temperatura de incubação: 100 °C	Temperatura de incubação: 100 °C
Razão de Split 1:10	Razão de Split 1:2	Razão de Split 1:10	Razão de Split 1:2	Razão de Split 1:10	Razão de Split 1:2	Razão de Split 1:10	Razão de Split 1:2
Temperatura do injetor: 180°C	Temperatura do injetor: 180°C	Temperatura do injetor: 130°C	Temperatura do injetor: 180°C	Temperatura do injetor: 180°C			
Temperatura da seringa: 110°C	Temperatura da seringa: 100°C	Temperatura da seringa: 110°C	Temperatura da seringa: 100°C	Temperatura da seringa: 100°C	Temperatura da seringa: 110°C	Temperatura da seringa: 100°C	Temperatura da seringa: 110°C
Pipetagem da água: HandyStep®	Pipetagem da água: Automático	Pipetagem da água: Automático	Pipetagem da água: HandyStep®	Pipetagem da água: HandyStep®	Pipetagem da água: Automático	Pipetagem da água: Automático	Pipetagem da água: HandyStep®
Detector: Massas	Detector: DIC	Detector: DIC	Detector: Massas	Detector: DIC	Detector: Massas	Detector: Massas	Detector: DIC

Fonte: autoria própria

No Quadro 10 cada coluna representa uma configuração de análise para cada uma das oito amostras. Os ensaios foram realizados em duplicata, resultando em dezesseis soluções de tolueno $7,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ (p. 31), além de duas curvas normais preparadas da mesma maneira descrita para o teste de linearidade (p. 31).

As amostras foram analisadas de acordo com as condições cromatográficas apresentadas no Quadro 5 (p. 26), alterando parâmetros específicos para a realização do teste de robustez (Quadro 10; p. 34).

Após obtenção dos dados, procedeu-se com a análise da variância destes utilizando-se do *software* R (versão 3.4.3).

3.4 Limites de detecção e quantificação

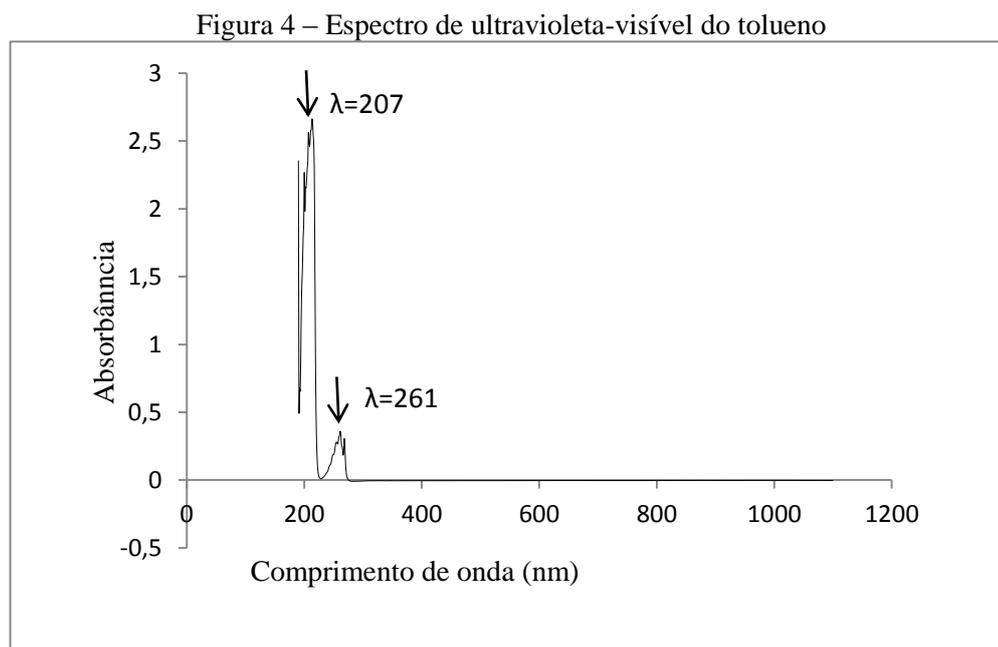
Para calcular o limite de detecção e o limite de quantificação do método, foram utilizados os dados referentes à curva de calibração avaliada no teste de linearidade, aplicados nas equações 2 (p. 17) e 3 (p. 18).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do tolueno

4.1.1 Espectroscopia de UV-Vis

No espectro de ultravioleta-visível obteve-se bandas de absorção apenas na região do ultravioleta, destacando-se duas bandas com comprimento de onda máximo igual a 207 nm e 261 nm, conforme apresentado na Figura 4.



Fonte: autoria própria.

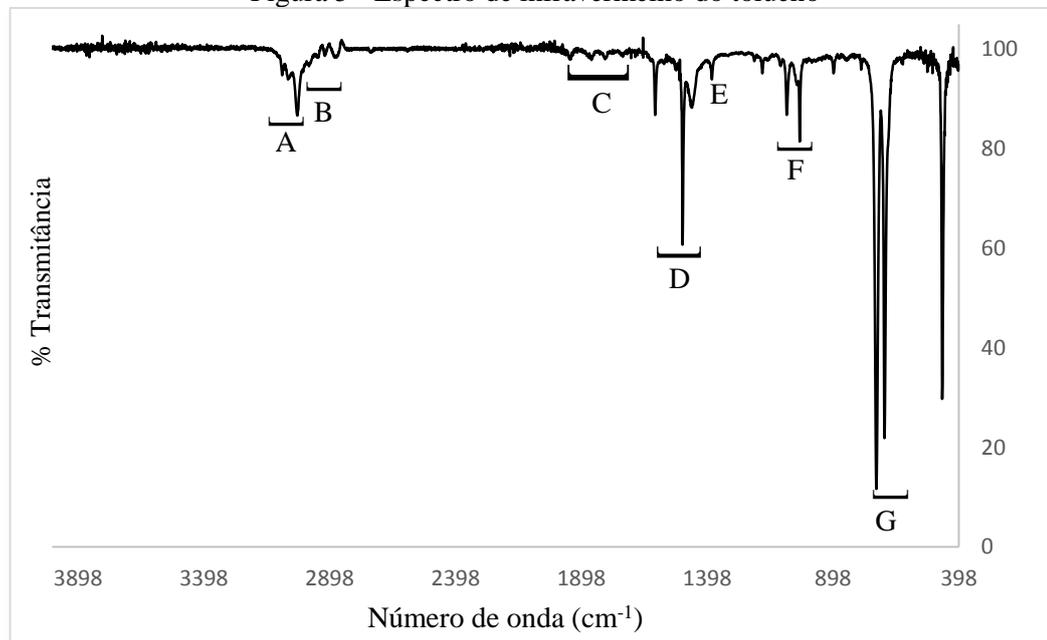
O espectro de ultravioleta obtido é característico de compostos aromáticos devido a faixa e intensidade de absorção das bandas geradas. Segundo PAVIA *et al.* (2015), deveriam ser observadas duas bandas de absorção: uma de maior intensidade, com $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 206 nm e outra de menor intensidade com $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 261 nm. E ao observar a Figura percebe-se que os valores obtidos de $\lambda_{\text{máx}}$ para as bandas estão de acordo com o esperado.

Além disso, observou-se um aumento nos valores dos $\lambda_{\text{máx}}$ das referidas bandas quando comparadas aos $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do benzeno, o que reforça a hipótese que a amostra realmente se trata do tolueno, pois o deslocamento dessas bandas são consequência do efeito indutivo doador de elétrons que o grupo metila (auxócromo) exerce sobre o anel. Reitera-se que a ausência de bandas de absorção em comprimentos de onda diferentes dos esperados implica na possível ausência de contaminantes, de mesmo perfil químico, na amostra.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho

Após a análise, obteve-se o espectro apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Espectro de infravermelho do tolueno



Fonte: autoria própria.

No Quadro 12 são apresentadas as bandas observadas no espectro de infravermelho e suas respectivas interpretações conforme a literatura.

Quadro 12 – Principais interações obtidas no espectro de IV do tolueno.

Identificação das bandas	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo	Modo vibracional
A	3027, 3061 e 3086	=C-H aromático	Deformação axial
B	2980 e 2871	-CH ₃	Estiramento de ligação C _{sp³} -H
C	2000 a 1667	=C-H aromático	Bandas harmônicas e de combinação
D	1606, 1497 e 1465	C=C	Deformação axial
E	1379	CH ₃ alifático	Deformação angular simétrica
F	1031, 1082 e 1179	= C-H	Deformação angular no plano do anel
G	726 e 694	=C-H	Deformação fora do plano do anel

Fonte: autoria própria.

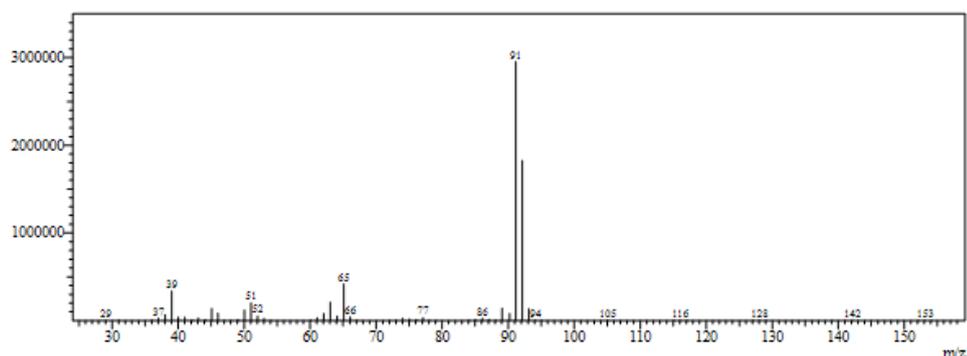
Na análise do espectro de IV podem ser destacadas as bandas encontradas entre 3027 cm⁻¹ e 3086 cm⁻¹ referentes a deformação axial C-H de carbonos sp² e as bandas de deformação axial C=C entre 1465 cm⁻¹ e 1606 cm⁻¹ típicas de compostos aromáticos, obtidos conforme esperado e condizentes com os valores informados por Barbosa (2007).

No que diz respeito as bandas que evidenciam que a substância analisada se trata do tolueno, podem ser destacadas bandas fortes e agudas encontradas em 726 cm^{-1} e 694 cm^{-1} e o padrão de combinação obtido entre 2000 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} , características de compostos aromáticos monossustituídos, além das bandas encontradas em 2980 cm^{-1} e 2871 cm^{-1} , e em 1379 cm^{-1} , relacionadas especificamente ao grupo CH_3 . As bandas não listados correspondem às regiões de *fingerprint* para as quais não cabe interpretação do espectro por apresentar maior grau de complexidade. Desta forma, consideram-se os resultados satisfatórios e condizentes com a literatura: Barbosa (2007) e Pavia *et al.* (2015).

4.1.3. Espectrometria de massas

A seguir, na Figura 6, evidencia-se o espectro de massas da amostra de tolueno:

Figura 6 - Espectro de massas do tolueno.

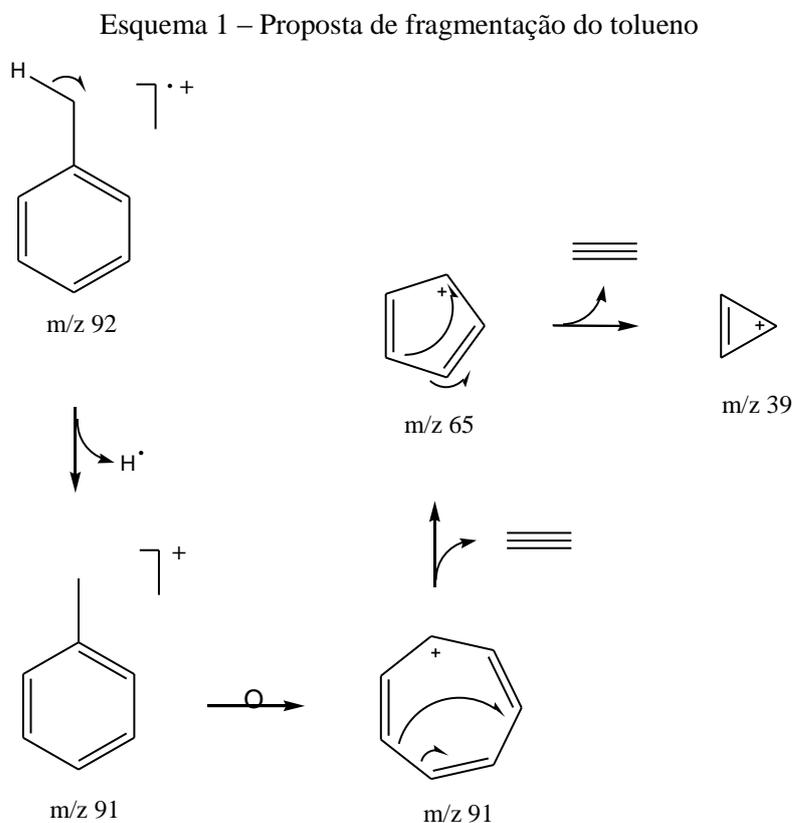


Fonte: autoria própria.

Observando-se o espectro gerado, bem como os dados disponíveis em Pavia *et al.* (2015) e Silverstein, Webster e Kiemle (2006), podem ser destacados os fragmentos de m/z 91 e 92, sendo o fragmento m/z 91 o mais abundante dentre os encontrados. Este sinal corresponde ao cátion tropílio, gerado devido a um rearranjo estrutural do fragmento original de m/z 91, formando o referido cátion aromático de alta estabilidade (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). O íon molecular m/z 92 é o segundo mais intenso, formado após a perda de um dos elétrons π devido à ação do feixe de elétrons. Por formar um cátion radicalar com capacidade de efetuar deslocalizações eletrônicas, o íon molecular apresenta a referida estabilidade.

Os sinais com m/z 65 e m/z 39, embora sejam pouco intensos no espectro, são também importantes para a caracterização do tolueno, pois, estes somados aos outros dois de maior

intensidade definem um padrão de fragmentação típico, ocasionado devido eliminação de uma molécula neutra de acetileno do cátion tropílio e outra perda de acetileno, desta vez sofrida pelo cátion ciclopentadieno, conforme o Esquema 1.



Conforme demonstrado, os resultados condizem com o esperado para o tolueno. Ressalta-se inclusive que, a comparação do espectro de massas obtido com a biblioteca NIST presente no software do equipamento Shimadzu QP 2010 Ultra, resulta na identificação do tolueno com um índice de similaridade de 97% para as sete primeiras identificações possíveis dentre as dez de maior probabilidade.

4.2 Determinação do teor da SQC

Após as análises cromatográficas e de umidade obteve-se os resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Obtenção do teor final do tolueno

Análise	Resultados (%)*
Teor de tolueno inicial	99,97873 ± 0,00031
Umidade (Karl Fischer)	0,215 ± 0,035
Teor Corrigido	99,764 ± 0,036

* $\bar{X} \pm S$; = 0,01

Fonte: autoria própria

O resultado final foi corrigido utilizando-se o teor de água analisado pelo método Karl Fischer coulométrico, já que o detector utilizado no método de quantificação (DIC) não é sensível a esta impureza.

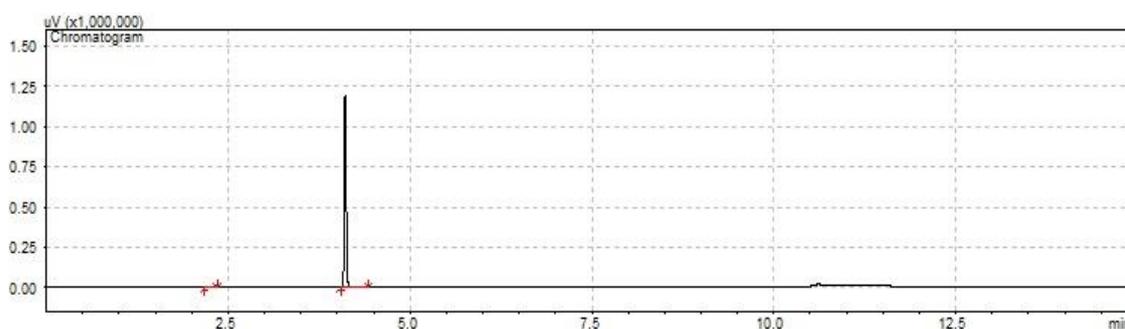
O teor encontrado foi próximo do informado pelo fabricante PanReac, que através de certificado de análise atestou para o tolueno utilizado um valor de teor igual a 99,8 % .

4.3 Validação analítica

4.3.1 Seletividade

No teste de seletividade, foram preparadas soluções com os possíveis interferentes da análise, a fim de comprovar que o método é seletivo ao analito em questão. Dessa forma, obteve-se os cromatogramas a seguir.

Figura 7 - Cromatograma do tolueno

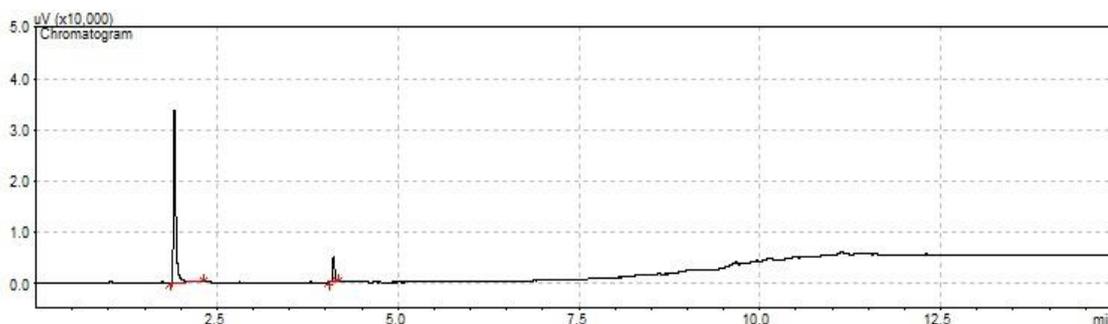


Fonte: autoria própria.

Na Figura 7 nota-se a presença de um pico com tempo de retenção 4,108 min correspondente ao tolueno, segundo as condições analíticas em questão.

O cromatograma obtido para a solução padrão de acetona é mostrado na Figura 8.

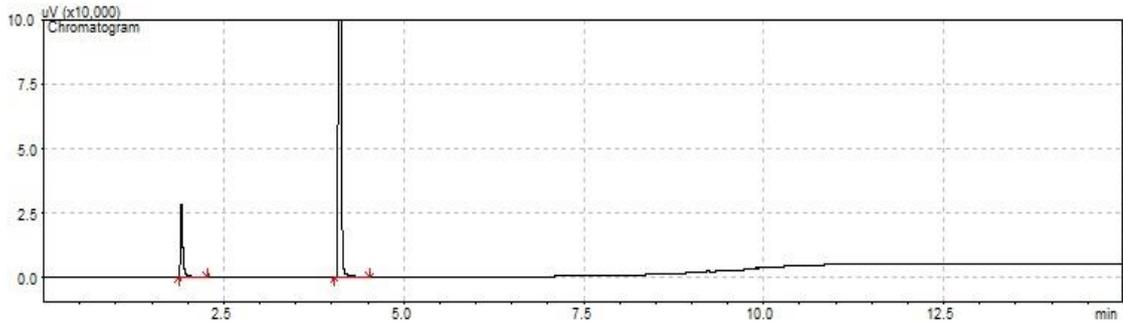
Figura 8 – Cromatograma da acetona



Fonte: autoria própria.

O pico obtido para a acetona, segundo as condições analíticas, apresentou tempo de retenção de 1,912 min. Na Figura 9 tem-se o cromatograma da solução padrão combinada.

Figura 9 - Cromatograma do padrão combinado de tolueno e acetona

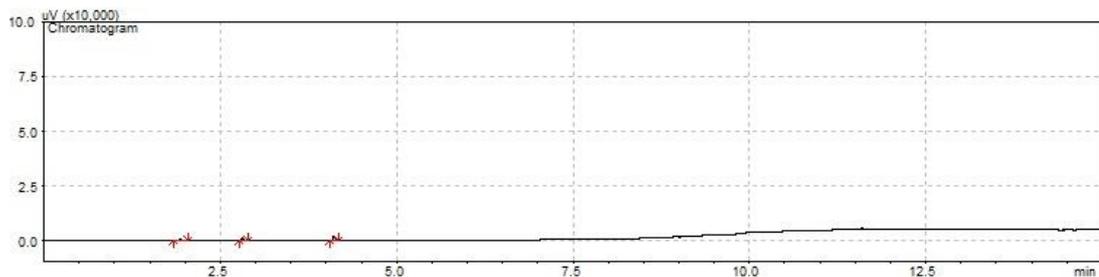


Fonte: autoria própria.

Pode-se perceber a presença dos picos referentes a acetona e ao tolueno com os respectivos tempos de retenção de 1,912 e 4,107 min. Ou seja, os mesmos tempos de retenção obtidos para as soluções quando analisadas separadamente. Desta forma, percebe-se que as referidas substâncias, quando juntas, não interagem entre si, já que conservam os mesmos tempos de retenção obtidos quando analisadas separadamente (Figuras 7 e 8).

O cromatograma da solução problema de soro é apresentado na Figura 10.

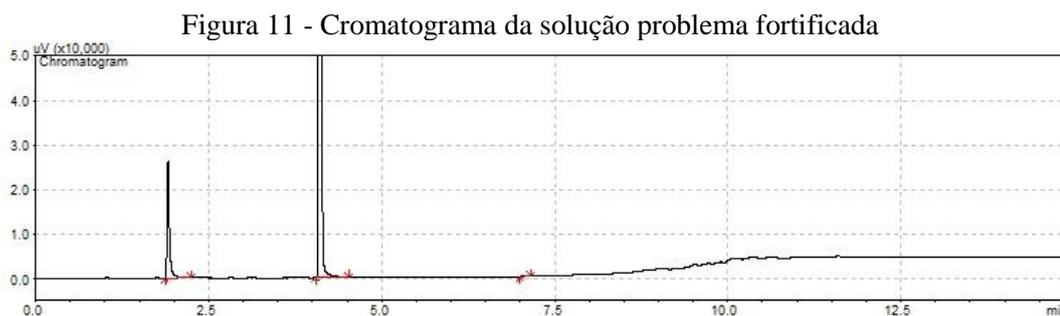
Figura 10 - Cromatograma do soro hiperimune



Fonte: autoria própria.

No cromatograma da solução problema nota-se a presença de picos de pequena intensidade, mas muito inferiores àqueles observados para as soluções padrão analisadas. E, como a altura dos picos está muito abaixo dos limites de quantificação do presente estudo, foram considerados como não detectados.

Por fim, o cromatograma da solução problema fortificada está apresentado na Figura 11 (p. 42).



Fonte: autoria própria.

No cromatograma anterior nota-se a presença dos picos com tempo de retenção 1,912 min correspondente à acetona e 4,107 min correspondente ao tolueno, segundo as condições analíticas em questão, sendo estes valores idênticos aos obtidos nos cromatogramas dos padrões puros.

Na Tabela 9 estão apresentados os tempos de retenção nas soluções individuais de acetona e tolueno e também nas soluções dessas substâncias combinadas e com a presença do soro hiperimune.

Tabela 9 - Dados comparativos entre os solventes tolueno e acetona.

Amostra analisada	Solvente	Tempo de retenção (min)	DPR entre os tempos de retenção
Solução padrão de tolueno	Tolueno	4,108	Não se aplica
Solução padrão de acetona	Acetona	1,912	Não se aplica
Solução padrão combinada de tolueno e acetona	Acetona e Tolueno	1,912 e 4,107	0 % e 0,02%
Solução problema fortificada	Acetona e Tolueno	1,912 e 4,107	0 % e 0,02%

Fonte: autoria própria.

Como é possível verificar na Tabela 9, não houve DPR superior a 1% nos tempos de retenção da acetona e do tolueno, dada a mistura dessas substâncias, nem com a adição do soro hiperimune. Portanto, o método é considerado seletivo nas condições analíticas em questão.

4.3.2 Linearidade

4.3.2.1 Curva usual

Os resultados do teste de linearidade foram obtidos utilizando-se dos dados constantes na Tabela 10 (p.43) .

Tabela 10- Parâmetros dos testes de linearidade

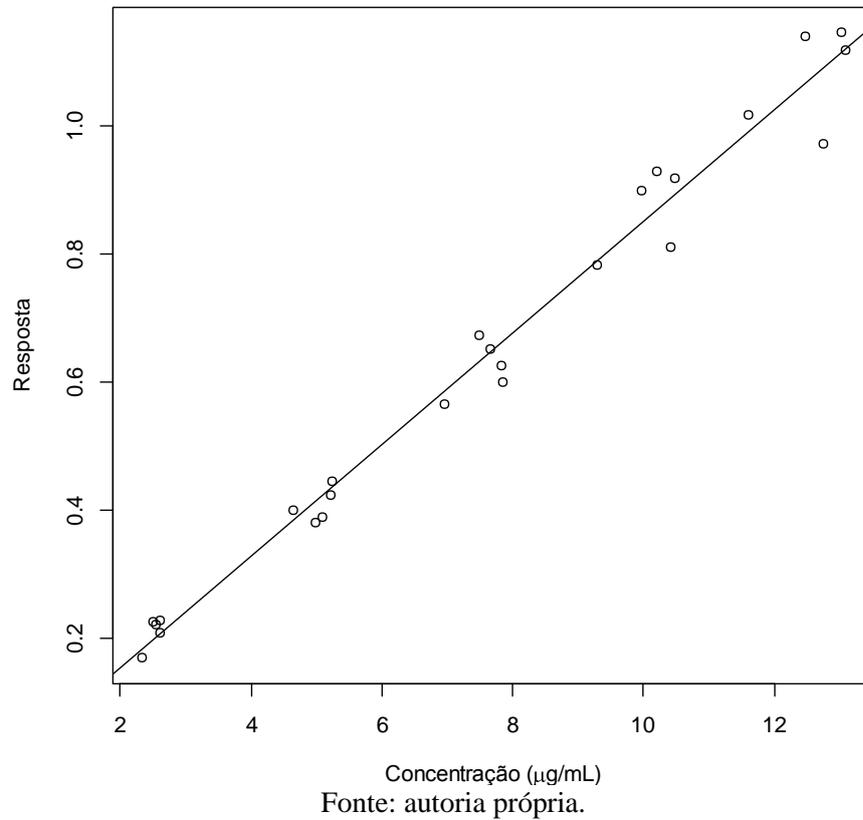
Ponto	Curva	Nível	Massa de tolueno (mg)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área da acetona	Área do tolueno	Resposta
1		1		2,321	2360304	400574	0,170
2		2		4,643	2279095	913461	0,401
3	1	3	34,82	6,964	2082849	1181321	0,567
4		4		9,285	2017986	1579631	0,783
5		5		11,61	1934473	1970031	1,018
6		1		2,550	2093796	463557	0,221
7		2		5,100	2108004	822288	0,390
8	2	3	38,25	7,650	2002462	1306581	0,652
9		4		10,20	2041296	1897821	0,923
10		5		12,75	2346414	2281164	0,972
11		1		2,495	19589667	442094	0,226
12		2		4,989	2012207	768167	0,382
13	3	3	37,42	7,484	1973925	1331683	0,675
14		4		9,979	2013442	1812113	0,900
15		5		12,47	1842844	2103487	1,141
16		1		2,618	1959523	446341	0,228
17		2		5,236	1858499	829083	0,446
18	4	3	39,27	7,854	2042898	1227669	0,601
19		4		10,47	2049763	1882393	0,918
20		5		13,09	1967626	2202591	1,119
21		1		2,607	2046863	430244	0,210
22		2		5,213	2044199	865465	0,423
23	5	3	39,10	7,820	1456651	911949	0,626
24		4		10,43	1366328	1107500	0,810
25		5		13,03	1975027	2263775	1,146

Fonte: autoria própria

Com os dados da Tabela 7 elaborou-se a regressão linear simples (Gráfico 1; p.44), conforme Equação 1 (p. 14), em que o termo “resposta” apresentado no eixo y corresponde à razão entre as áreas de tolueno e acetona.

Dada a distribuição dos pontos, pode-se estimar um comportamento linear dos resíduos. Ressalta-se que embora a inspeção visual seja propensa a erros de interpretação, utilizou-se esta ferramenta como análise prévia, de forma que ela pudesse complementar os testes estatísticos convencionais.

Gráfico 1- Dispersão de pontos com regressão linear



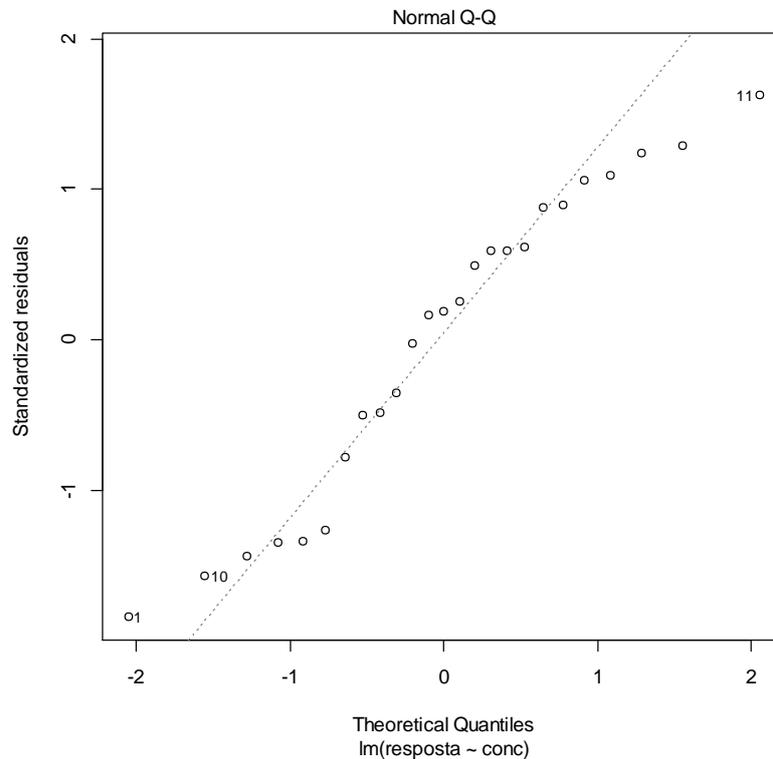
1. Valores suspeitos e pontos de alavanca/outliers

A presença de valores suspeitos foi realizada pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife. Entre todos os dados, apenas um valor *outlier* (ponto 10) foi caracterizado, tendo em vista o conjunto homocedástico. Desta forma, o referido ponto foi excluído do conjunto de dados, já que para o teste estatístico em questão, podem ser excluídos até 22% de dados considerados como *outliers*.

2. Análise de normalidade

Para avaliar se os resíduos seguem a distribuição normal, os dados foram submetidos ao teste estatístico de *Ryan-Joiner* que avalia a correlação entre os resíduos e se eles possuem ou não comportamento normal, conforme mostrado no Gráfico 2 (p.45).

Gráfico 2 - Correlação entre os resíduos da curva usual



Fonte: autoria própria

No presente teste partiu-se da hipótese nula (H_0) de que os resíduos seguem a distribuição normal e da hipótese alternativa (H_a) de que os resíduos não estão associados à uma distribuição normal. O valor encontrado para o p-valor do teste de hipóteses foi igual a 0,3868, sendo assim, como o p-valor é maior que o nível de significância (0,05), não se pode rejeitar H_0 .

3. Homoscedasticidade

Conforme descrito em Brasil (2017), verificou-se a homoscedasticidade dos resíduos confrontando a hipótese nula (H_0) de que as variâncias dos resíduos das recuperações aparentes não diferem entre si (homoscedasticidade), contra a hipótese alternativa (H_a) de que as variâncias dos resíduos são diferentes (heteroscedasticidade). Para isso, os resíduos foram submetidos ao teste de *Breush-Pagan* para verificar as variâncias destes. Como resultado do referido teste obteve-se p-valor igual a 0,005, rejeitando H_0 . Após o resultado obtido, realizou-se novamente o teste de resíduos padronizados de *Jackknife*, sendo que nenhum ponto foi considerado *outlier* ao se tratar os resíduos como heteroscedásticos.

Devido ao resultado, pode-se afirmar que o modelo correto para previsão dos resultados analíticos é o modelo linear com pesos, portanto todos os testes relativos à análise da curva de calibração se referem a esta forma de modelagem dos dados.

4. *Independência dos resíduos*

A avaliação da independência dos resíduos foi estudada a fim de verificar a estrutura ou aleatoriedade dos resíduos da regressão, a fim de determinar possíveis autocorrelações de primeira ordem. Para tanto os resíduos foram submetidos ao teste de *Durbin-Watson*.

A hipótese nula (H_0) admitida foi que não haveria autocorrelação entre os resíduos, ou seja, haveria independência entre estes. Já a hipótese alternativa (H_a) é de que haveria independência e, portanto, autocorrelação.

O p-valor encontrado foi igual a 0,4853 e, como este valor é maior que o nível de significância (0,05), não houve rejeição de H_0 . De forma prática pode-se inferir que devido ao fato dos resíduos serem independentes não houve indícios de que uma análise cromatográfica interferiria na análise seguinte.

5. *Análise da curva de calibração*

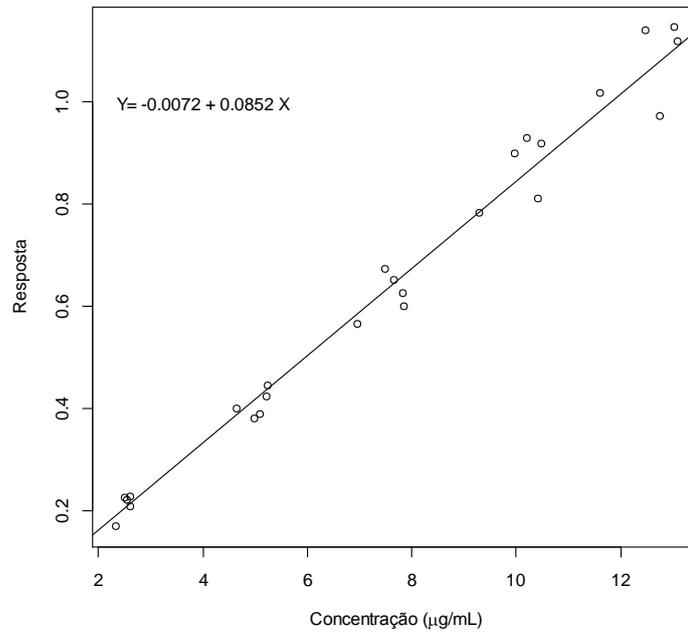
Para a avaliação da curva de calibração utilizou-se o teste de variância por ANOVA, realizando-se primeiramente a análise da regressão linear por meio do teste F. No referido testes partiu-se da hipótese nula (H_0) de que o coeficiente angular é igual a zero e da hipótese alternativa (H_a) de que o coeficiente angular é diferente de 0 (zero). O p-valor obtido foi menor que $2,2 \times 10^{-16}$, sendo menor que o nível de significância (0,05). Dessa forma, a hipótese nula (H_0) foi rejeitada, significando que o coeficiente angular difere de 0 (zero).

Em seguida, realizou-se o teste de ajuste do modelo partindo-se da hipótese nula (H_0) de que o ajuste matemático é satisfatório e da hipótese alternativa (H_a) de que o ajuste matemático não é satisfatório. O p-valor calculado foi igual a 0,6935, ou seja, não houve indícios suficientes para rejeitar H_0 .

Por fim, determinou-se os coeficientes da regressão linear através do teste do coeficiente de correlação de *Pearson*, quando obteve-se o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9933 e o coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9867. Desta forma, obteve-se como modelo final, a regressão linear mostrada no Gráfico 3 (p. 47) e a distribuição dos resíduos no

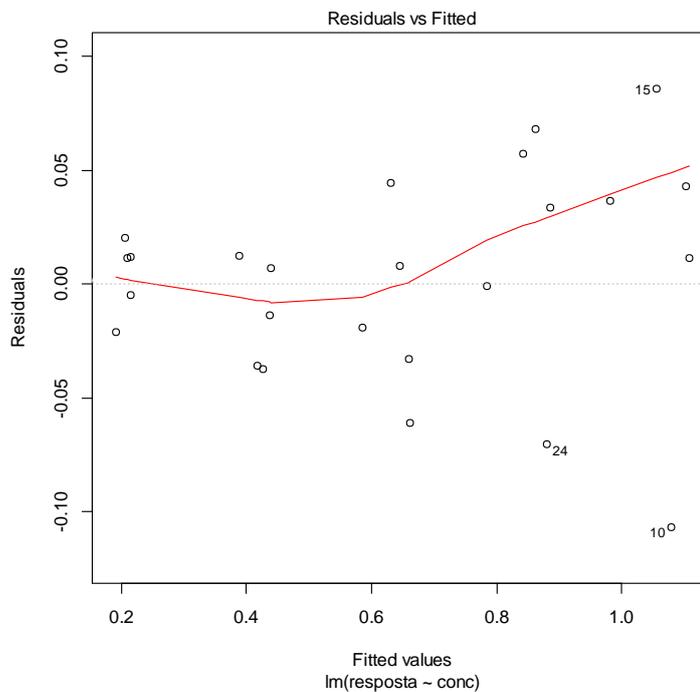
Gráfico 4. Reitera-se que os resultados obtidos foram satisfatórios já que o valor encontrado para r foi superior a 0,990 e o coeficiente angular (Gráfico 3) foi diferente de 0, conforme determinado por Brasil (2017).

Gráfico 3 - Dispersão de pontos com a regressão linear definitiva



Fonte: autoria própria.

Gráfico 4 - Distribuição final dos resíduos



Fonte: autoria própria.

No Gráfico 4 observa-se uma linha reta que o divide correspondendo ao valor 0 (zero) do eixo y e uma linha em vermelho que descreve a tendência dos resíduos da análise. Conforme mostrado por essa segunda linha a média dos resíduos tende a distanciar-se de 0 (zero) a medida que aumenta-se a concentração no eixo x. Este comportamento é perfeitamente aceito para o trabalho em questão já que descreve justamente o comportamento heteroscedástico já citado anteriormente.

4.3.2.2 Curva matrizada

Os resultados obtidos para a curva matrizada são os constantes na Tabela 11.

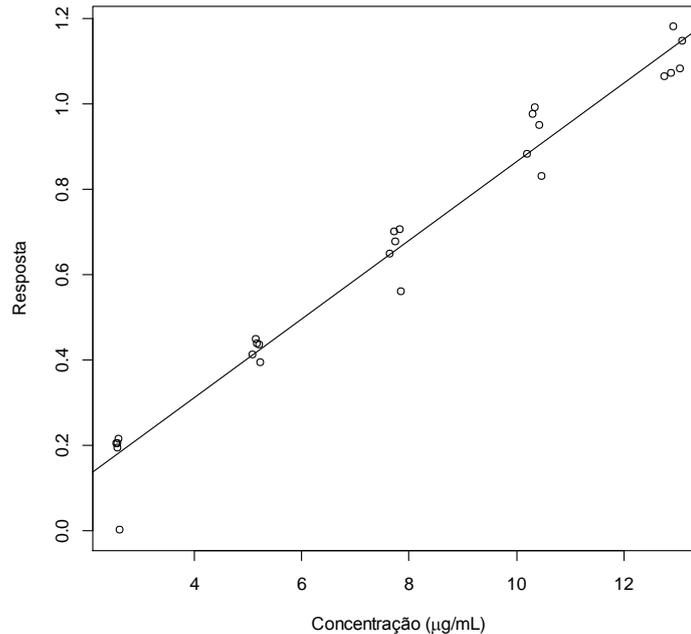
Tabela 11 - Resultados referentes à curva matrizada

Ponto	Curva	Nível	Massa tolueno (mg)	Concentração (µg mL ⁻¹)	Área acetona	Área tolueno	Resposta
1		0		-	2655725	4763	0,002
2		1		2,548	2637110	536736	0,203
3		2		5,096	2548086	1046881	0,411
4	1	3	38,22	7,644	2338825	1514178	0,647
5		4		10,19	2267097	2000259	0,882
6		5		12,74	2418224	2571525	1,063
7		0		-	215061	9347	0,004
8		1		2,583	2457312	476579	0,194
9		2		5,165	2322683	1019305	0,439
10	2	3	38,74	7,748	2178937	1477572	0,678
11		4		10,33	2223900	2203239	0,991
12		5		12,91	2289351	2701027	1,178
13		0		-	2293747	7463	0,003
14		1		2,605	2307577	498589	0,216
15		2		5,211	2372015	1030505	0,434
16	3	3	39,08	7,816	2324204	1642410	0,707
17		4		10,42	2317084	2202431	0,950
18		5		13,03	2221039	2407385	1,083
19		0		-	2109870	6355	0,003
20		1		2,572	2273180	465795	0,205
21		2		5,144	2196573	983920	0,448
22	4	3	38,58	7,716	2249812	1574523	0,700
23		4		10,29	2283765	2230925	0,977
24		5		12,86	2123590	2274383	1,071
25		0		-	2228169	6468	0,003
26		1		2,613	1518530	1131	0,001
27		2		5,227	1129849	446495	0,395
28	5	3	39,20	7,840	1124555	629626	0,560
29		4		10,45	1235710	1025079	0,829
30		5		13,07	1090967	1250002	1,146

Fonte: autoria própria

Assim como foi realizado na análise de linearidade da curva usual, procedeu-se com uma inspeção visual da regressão linear (conforme Equação 1 p. 14) da referente curva, antes de se realizar os tratamentos estatísticos pertinentes, desta forma obteve-se a reta mostrada no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Regressão linear para a curva matrizada sem tratamento estatístico



Fonte: autoria própria.

Observando-se a curva mostrada no Gráfico 5, estima-se que houve um bom ajuste entre os pontos e o modelo linear, exceto em um ponto claramente disperso dos demais, no qual nota-se a concentração do tolueno como zero, indicando assim um provável erro grosseiro no preparo da amostra quando provavelmente se esqueceu de adicionar o padrão de tolueno no *vial*. Ainda assim procedeu-se com os testes estatísticos inerentes ao dados, já que estes ponto poderia ser excluído como *outlier*.

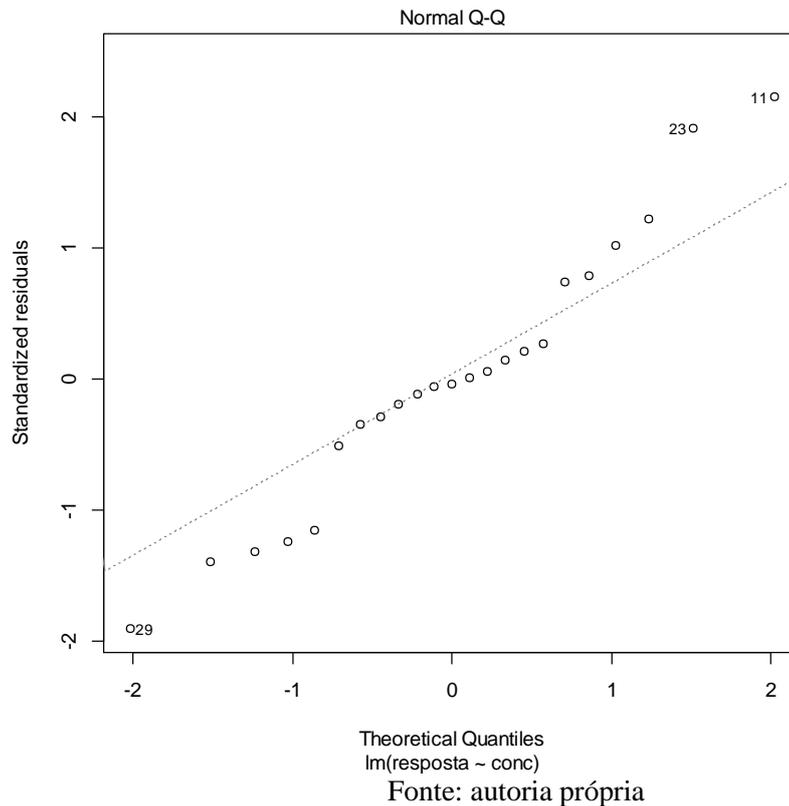
1. Valores suspeitos e pontos de alavanca/outliers

Ao realizar o teste de resíduos padronizados “*Jackknife*” verificou-se a presença dos pontos 26 e 28 como *outliers*. Já que no referido testes podem ser excluídos até 22 % dos valores originais, então procedeu-se com a exclusão dos referidos pontos nos demais tratamentos estatísticos.

2. Análise de normalidade

Utilizando-se do teste de *Ryan-Joiner* obteve-se a correlação entre resíduos mostrada no gráfico 6.

Gráfico 6 - Correlação entre os resíduos da curva matrizada



No referido teste partiu-se da hipótese nula (H_0) de que os resíduos seguem a distribuição normal, e da hipótese alternativa (H_a) de que estes seguem outra distribuição de probabilidade. O valor encontrado para p-valor foi de 0,596. Como o valor de p-valor é maior que 0,05, pode-se inferir que não houve rejeição da hipótese nula. Portanto, os resíduos seguem a distribuição normal.

3. Homoscedasticidade da curva matrizada

A homoscedasticidade dos resíduos das curva matrizada foi verificada conforme recomendado em Brasil (2017) confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos das recuperações aparentes não diferem entre si (há homoscedasticidade) contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade). Para

isso, os resíduos foram submetidos ao teste de *Breush-Pagan* para verificar as variâncias destes.

O valor encontrado para p-valor foi de 0,0199. Como o valor de p-valor foi menor que 0,05, houve rejeição da hipótese nula. Portanto assim como na curva normal os resíduos foram considerados heteroscedásticos.

Devido ao resultado deste teste, o modelo correto para previsão dos resultados analíticos foi o modelo linear com pesos, sendo assim, todos os testes relativos à análise da curva de calibração da curva matricizada se referem a esta forma de modelagem dos dados.

4. *Independência dos resíduos*

A avaliação da independência dos resíduos foi realizada através do teste de *Durbin-Watson*, partindo-se da hipótese nula de que não haveria autocorrelação entre os resíduos (independência) e da hipótese alternativa de que haveria autocorrelação entre os resíduos. No referido teste obteve-se p-valor como 0,176, sendo assim não houve rejeição da hipótese nula. Portanto, não houve autocorrelação dos resíduos, isto é, estes são independentes o que demonstra que uma análise realizada não interferirá na análise subsequente.

5. *Análise da curva de calibração*

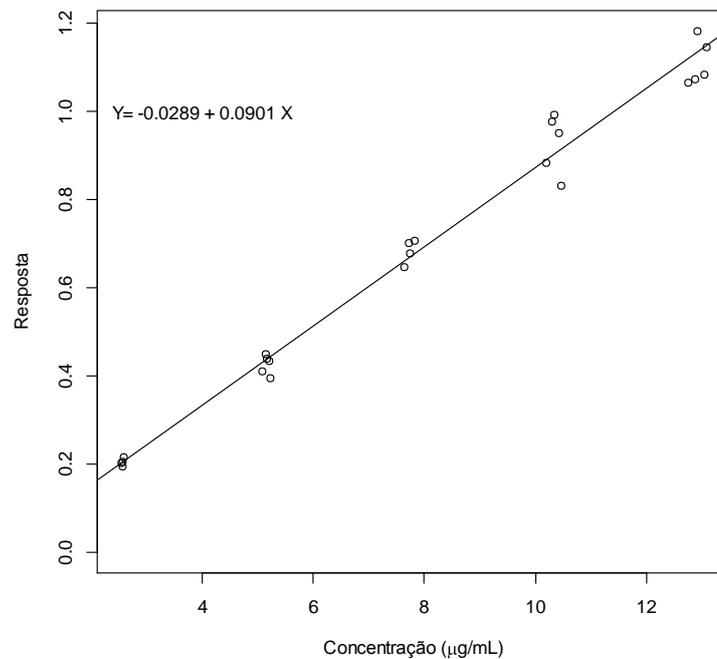
A análise da curva de calibração foi feita pelo modelo de ANOVA, e para tanto realizou-se primeiramente o teste F, afim de se analisar a regressão linear desta. No referido teste partiu-se da hipótese nula (H_0) de que a regressão não é significativa e da hipótese alternativa (H_a) de que a regressão é significativa. O valor encontrado para p-valor foi menor que $2,2 \times 10^{-16}$. Como o valor de p-valor é menor que 0,05, pode-se inferir que houve rejeição da hipótese nula. Portanto, a regressão é significativa.

O segundo teste realizado foi o teste de ajuste ao modelo, quando se propôs a hipótese nula de que o modelo proposto é correto e a hipótese alternativa de que o modelo é incorreto. Para o referido teste encontrou-se p-valor como 0,2989, sendo assim pode-se inferir que não houve rejeição da hipótese nula. Portanto, o modelo linear com pesos é correto, isto é, não houve falta de ajuste ao modelo.

Os coeficientes de determinação e de correlação foram determinados por meio do coeficiente de correlação de *Pearson*, quando encontrou-se o r igual a 0,9918 e o r^2 igual a

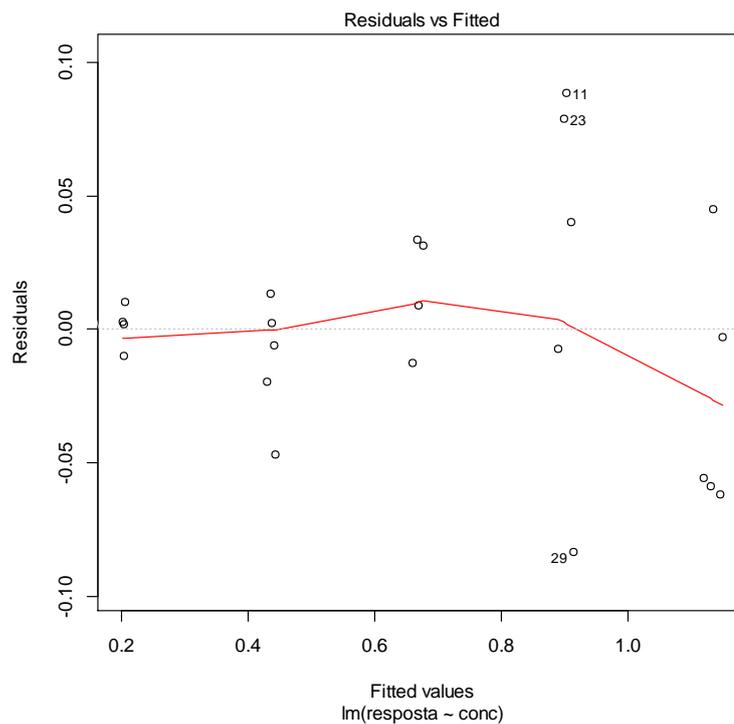
0,9838. Nos gráficos 7 e 8 é possível ver respectivamente o modelo final da curva bem como a distribuição dos resíduos. Os resultados obtidos foram satisfatórios pois o valor encontrado para r foi maior que 0,990 e o coeficiente angular obtido diferente de 0 (BRASIL, 2017).

Gráfico 7 - Modelo final da curva matrizada



Fonte: autoria própria.

Gráfico 8 - Distribuição dos resíduos da curva matrizada



Fonte: autoria própria.

Neste estudo comprovou-se que os dados da curva de calibração matrizada não possuem variância constante (homoscedasticidade), sendo assim, todos os testes relativos a esta foram aplicados ao modelo de regressão linear com pesos, por serem os mais adequados a esta situação. A heteroscedasticidade dos resíduos pode ser observada no Gráfico 8 pela linha de tendência que mostra que a média dos resíduos se distancia de 0 (zero) a medida que aumenta-se a concentração do analito.

4.3.2.3 Comparação entre as curvas usual e matrizada

Para a verificação de um possível efeito de matriz, a intercessão e a inclinação das retas obtidas a partir da leitura das soluções com e sem a presença do soro foram comparadas através de um teste de médias (teste T) e os intervalos de confiança comparados em um nível de significância de 95%. Neste teste partiu-se da hipótese nula de que as médias são iguais e da hipótese alternativa de que as médias não são iguais

Para a intercessão o teste estatístico retorna p-valor 0,10982 e para a inclinação p-valor 0,08289, como ambos são maiores que 0,05 a hipótese nula é aceita. Portanto, as curvas são iguais. Os intervalos de confiança são apresentados na Tabela 9.

Tabela 12 - Intervalos de confiança da intercessão e inclinação das curvas de calibração

Curva	Mínimo (2,5%)	Máximo (2,5%)
Intercessão sem matriz	-0,0270	0,0126
Intercessão com matriz	-0,0477	-0,0102
Inclinação sem matriz	0,0809	0,0895
Inclinação com matriz	0,0863	0,0939

Fonte: autoria própria

Conforme demonstrado, a comparação entre as curvas contendo ou não o soro hiperimune, indica que a presença da matriz não produz efeito significativo para alterar o resultado da quantificação feita pela curva de calibração. Portanto, infere-se que não houve efeito de matriz na análise de tolueno em soro hiperimune.

4.3.3. Precisão e exatidão

Para avaliação do parâmetro de precisão calculou-se o percentual de recuperação das amostras e os valores encontrados foram lançados na curva de calibração para que as concentrações de cada amostra fossem encontradas. Em seguida, foi feita a razão entre o valor encontrado e o valor adicionado. Na Tabela 13 (p. 54) são apresentados os valores de recuperação encontrados para as amostras.

Observando-se a referida tabela percebe-se que os valores de recuperação obtidos encontram-se no intervalo entre 80,0% e 110,0% conforme preconizado em Official Methods of Analysis (2012), para os níveis 2 e 3 de concentração. O nível 1 apresentou valores fora dessa faixa, mesmo com a identificação de um *outlier* na amostra 6 do dia 1. Desta forma, o método foi considerado exato para os níveis 2 e 3 e inexato para o nível 1.

Tabela 13 – Valores de recuperação para teste de precisão

DIA 1				DIA 2			
Amostra	Nível	Resposta	% de recuperação	Amostra	Nível	Resposta	% de recuperação
1	1	0,192	88,00	1	1	0,197	114,0
2	1	0,210	97,08	2	1	0,201	115,5
3	1	0,2486	113,6	3	1	0,193	112,9
4	1	0,242	108,2	4	1	0,095	63,52
5	1	0,209	95,51	5	1	0,167	99,50
6	1	0,207	96,49	6	1	0,191	110,3
7	2	0,730	100,2	7	2	0,552	97,28
8	2	0,642	90,22	8	2	0,596	103,9
9	2	0,693	97,97	9	2	0,587	103,8
10	2	0,702	96,90	10	2	0,549	97,26
11	2	0,683	94,53	11	2	0,541	96,01
12	2	0,717	100,9	12	2	0,515	90,38
13	3	1,120	90,96	13	3	0,923	95,54
14	3	1,059	87,56	14	3	0,983	100,9
15	3	1,160	96,69	15	3	0,871	90,92
16	3	1,232	100,2	16	3	0,851	88,75
17	3	1,186	96,65	17	3	0,969	100,7
18	3	1,057	88,09	18	3	1,030	105,3

Fonte: autoria própria.

A precisão do método foi avaliada por meio do tratamento estatístico dos dados de recuperação, no que diz respeito ao cálculo da normalidade das concentrações, bem como a homoscedasticidade destas.

Para avaliar a normalidade procedeu-se com o teste de *Ryan-Joiner*, partindo-se da hipótese nula (H_0) de que as concentrações seguem uma distribuição normal e da hipótese alternativa (H_a) de que estas seguem outra distribuição de probabilidade. Os valores encontrados para p-valor nos níveis 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 0,1337, 0,5013 e 0,5013. Como os valores de p-valor encontrados são maiores que 0,05, então não houve rejeição da hipótese nula e as concentrações portanto seguem a distribuição normal em todos os níveis estudados.

A homoscedasticidade das concentrações foi avaliada pelo teste *Brown & Forsythe*, partindo-se da hipótese nula (H_0) de que as variâncias dos desvios não são diferentes (homoscedásticos) e da hipótese alternativa (H_a) de que as variâncias dos desvios são diferentes (heteroscedásticos). Os valores encontrados de p-valor para os níveis 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 0,5228, 0,7231 e 0,5850. Como os vales de p-valor encontrados são maiores que 0,05, pode-se inferir que não há dados suficientes para rejeitar H_0 . Portanto, os desvios são homoscedásticos em todos os níveis estudados.

Após verificar a normalidade e a homoscedasticidade das concentrações, avaliou-se a variância de repetitividade e reprodutibilidade parcial pelo quadro de ANOVA. Assim, foram encontrados os seguintes valores de DPR para cada nível de concentração estudado apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – DPR calculado por nível de concentração

Nível de concentração	DPR encontrado (repetitividade)	DPR máximo (repetitividade)	DPR encontrado (reprodutibilidade parcial)	DPR máximo (reprodutibilidade parcial)
1	7,8 %	4,9 %	10,0 %	7,3 %
2	4,7 %	4,9 %	4,7 %	7,3 %
3	6,1 %	4,9 %	6,2 %	7,3 %

Fonte: autoria própria.

Conforme mostrado na Tabela 14, os níveis 2 e 3 apresentaram valores de desvio padrão relativo abaixo do valor limite de 7,3% para a reprodutibilidade parcial. No nível 1 observou-se um valor de desvio padrão maior que o preconizado, porém justificável pela proximidade da concentração estudada com a estimativa de limite de quantificação feita pela curva de calibração, motivo pelo qual pode se justificar a inexatidão do teste no referido nível. Como este nível está abaixo do nível de interesse do limite de tolueno em soro hiperimune, a precisão e a exatidão do método foram consideradas aceitáveis nos níveis de interesse.

4.3.4 Robustez

Após coleta dos resultados referentes aos testes realizados de acordo com o quadro 9, procedeu-se com análise estatística destes conforme mostrado na Tabela 15 (p.56).

De acordo com os resultados obtidos infere-se que os fatores tempo de incubação, temperatura de incubação, taxa de Split, temperatura do injetor e detector devem ser controlados a fim de evitar distorções no resultado analítico do método. Já variações na

temperatura da seringa e a precisão do instrumento de adição de água no *vial* não apresentam impactos significativos nos resultados do método.

Tabela 15 – Resultados da análise da robustez.

Variável	F _{calc}	valor P	Resultado
Tempo de incubação	7,190	0,0279	Significante
Temperatura de incubação	97,351	<0,001	Significante
Taxa de Split	617,461	<0,001	Significante
Temperatura do injetor	616,232	<0,001	Significante
Temperatura da seringa	3,541	0,0966	Não significativa
Pipetagem da água	1,137	0,3174	Não significativa
Detector	613,160	<0,001	Significante

Fonte: autoria própria.

A análise da interferência do instrumento de pipetagem foi incluída no teste de robustez propositalmente já que a utilização do *handyStep*[®] diminui o tempo de análise devido a praticidade deste equipamento. Como comprovado pelo teste a utilização do referido equipamento não interfere no método analítico, portanto sempre que possível recomenda-se o uso deste.

4.3.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos respectivamente com base nas equações 2 (p. 17) e 3 (p. 18), utilizando-se o desvio padrão do intercepto obtido na análise de linearidade e estimados em 0,361 µg/mL e 1,09 µg/mL, respectivamente. Os cálculos foram realizados no *software* R (versão 3.4.3) conforme mostrado no apêndice 1.

Considerando-se que a concentração de interesse para a tomada de decisão corresponde à, aproximadamente, 7,4 µg/mL, pode-se inferir que os limites de detecção e quantificação são adequados para o uso do método.

5. CONCLUSÃO

A caracterização da SQC através das técnicas de espectroscopia de UV-Vis, espectroscopia no IV e espectrometria de massas comprovou que esta tratava-se de fato do composto tolueno. Após a quantificação desta substância por CGDIC e a determinação do teor de umidade desta pela técnica de Karl Fischer coulométrico, determinou-se que a SQC possuía um teor percentual de $99,764 \pm 0,036$, ou seja, uma pureza próxima de 100 %. Considera-se ainda a utilização da SQC obtida, como um quesito importante do ponto de vista da redução de custo do processo de validação, já que as SQF são padrões analíticos com elevado custo financeiro.

Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios já que por estes foi possível concluir, após avaliar os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação, que o método de determinação do solvente residual tolueno por CGDIC nos soros hiperimunes para uso humano é adequado, podendo assim ser implantado nas condições de rotina do laboratório do serviço de controle físico-químico da Fundação Ezequiel Dias.

Ressalta-se que devido ao comportamento heteroscedástico do modelo linear do método, se deve aplicar este apenas para a determinação de traços (resíduos em baixa concentração) de tolueno, sendo que em níveis maiores de concentração do analito e portanto maior erro de medida (heteroscedasticidade), é essencial rever a metodologia em questão de forma a obter resultados confiáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **Reagent Chemicals: Specifications and Procedures for Reagents**. 11. Ed. Washington: ACS, 2016. 856 p.

AZEVEDO, A. P. de M. de. **Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional**. 2004. 162 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<https://teses.icict.fiocruz.br/pdf/azevedoapmm.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1 Ed. Viçosa: UFV, 2007. 189 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 79, de 24 de setembro de 2015. Proposta de método geral da Farmacopeia Mercosul: Solventes residuais. Resolução GMC Nº 22/14. Disponível em: < www.anvisa.com.br>. Acesso em: 24 Mai.2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5º edição. Brasília. Anvisa, 2010. 546p. v. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, DE 24 de Julho 2017. Dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos e das outras providências. Diário Oficial da União, 11 de julho de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Acidentes de trabalho por animais peçonhentos entre trabalhadores do campo, floresta e águas, Brasil 2007 a 2017**. Boletim epidemiológico v. 50, p. 1-14. Mar. 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.ause.gov.br/images/pdf/2019/marco/29/2018-059>.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora Nº 15: Atividades e operações insalubres. PORTARIA Nº 3.214, de 08 de Junho de 1978 (Diário Oficial da União, 06 de julho 1978).

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p.129-146, dez. 2003. Bimestral. Disponível em: <revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/3173/2546>. Acesso em: 18 maio 2019.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. “O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.” **Química Nova**, v. 31[s.l.], n. 3, p. 623-36, 2008.

COLLINS, C.H; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas. Editora da UNICAMP, 2006. 465 p.

FORSTER, L. M. K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S. L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.167-172, abr. 1994. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101994000200011>.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria industrial. Serviço de controle físico-químico. **Análises físico-químicas de plasma, soros hiperimunes para uso humano e seus intermediários**. Revisão 4. Belo Horizonte: FUNED, 2017.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria industrial. Serviço de controle físico-químico. **PVMA 048005/18 – Validação de método tolueno em soro hiperimune**. Revisão 00. Belo Horizonte: FUNED, 2018.

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

GONZALEZ, K. C.; SAGEBIN, F. R. OLIVEIRA, P. G.; GLOCK, L.; THIESEN, F. V. L. Estudo retrospectivo dos níveis de ácido hipúrico urinário em exames de toxicologia ocupacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1637-1641, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232010000700075>.

GRODOWSKA, K.; PARCZEWSKI, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 1, p. 3-12, nov. 2010.

HIGSON, S. P. J. **Química Analítica**. São Paulo: McGraw-Hill Companies. 2009. 452 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008, revisão 02: Orientações sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH), Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R6), Current Step 4 version dated October 20, 2016.

KULAY, L.A.; FRANCO, E.S.; AUGUSTO, L.S.K. Audition and exhibition to toluene - a contribution for the theme. **International Archives Of Otorhinolaryngology**, [s.l.], v. 16, n. 02, p.246-258, abr. 2012. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.7162/s1809-97772012000200015>.

MINAS GERAIS. Funed. Secretaria Estadual de Saúde (Comp.). **Produção de soros heterólogos e hiperimunes da Funed**. 2018. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/fazenda-experimental-sao-judas-tadeu/>>. Acesso em: 16 maio 2019.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 4. Ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2009. 490 p.

NETO, F. R. A; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicas afins**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2003. 187 p.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements**: Apêndice F. 19. Ed. Gaithersburg. AOAC, 2012. 17p.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000500048>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500048>. Acesso em: 18 maio 2019.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 5. Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 733 p.

PENTEADO, J.C.P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J.C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, [s.l.], v.31, n.8, p. 2190-2193, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA M. M.C.; MORANO, S. C.; SILVA L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.164-171, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000100029>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000100029&script=sci_abstract&tlng=es. Acesso em: 18 maio 2019.

SILVA, F.S.Q. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de metodologia para essa finalidade**. 2008. 165 f. Tese (Doutorado) – Pós graduação em vigilância sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em :<<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8252/2/11.pdf&ved=2ahUKEw>>. Acesso em 10 mai. 2019.

SILVERSTEIN, R. M; WBSTER, F. X.; KIELME, D. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. Ed. Rio de Janeiro. LTC editora, 2006. 530 p.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J; CROUCH, S.R. **Fundamentos de química analítica**. 8. Ed. São Paulo. Thomson. 2006. 1124 p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2001. 649 p. v.1.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2012. 648 p. v.1.

USA. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). United States Department of Labor (Org.). 1971. **Toluene**. Disponível em: <www.osha.gov/SLTC/toluene/index.html>. Acesso em: 28 mar. 2019.

USA. THE UNITED States Pharmacopeia. 2015. **Residual solvents USP 38**. 36 ed. Rockville: United States.

VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, M. F. Cromatografia Unificada. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

VISENTAINER, J. V.. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, p. 2, 274-279, 2012.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Script de comandos no *software* R para os cálculos de limite de detecção e quantificação.

```

R GUI [32-bit] - [C:\Users\tiago.aparecido\Documents\LQLD.R - Editor R]
Arquivo  Editar  Pacotes  Janelas  Ajuda

##Versões do R e dos Pacotes Instalados
Sys.time() #Data e hora do processamento.
R.Version()$version.string
installed.packages()[,c(1,3:4)]

#Linearidade
#Experimento 05/11/2018 - Curva usual
#Importação dos dados
dados <- read.csv2("curva2.csv",dec=",")
attach(dados)
tolueno <- as.numeric(as.character(X.2[X=="Tolueno"]))
acetona <- as.numeric(as.character(X.2[X=="Acetona"]))
razao <- tolueno/acetona
detach(dados)
massa <- rep(c(34.82,38.25,37.42,39.27,39.10),each=5)
aliq <- rep(c(1,2,3,4,5),times=5)
curva <- rep(c(1,2,3,4,5),each=5)
nivel <- rep(c(1,2,3,4,5),times=5)

#Concentracao em mg/mL
conc <- massa/25*aliq/100/6*1000

#tabela de dados para revisao
tabela <- data.frame(curva,nivel,massa,concentracao=conc,acetona,tolueno,resposta=razao)
rm(acetona,curva,massa,nivel,tolueno)
tabela
attach(tabela)

##Regreção com peso para dados heteroscedásticos
model <- lm(conc~resposta,weights=1/conc^2)

#Limite de detecção
summary(model)$coefficients[3]*3.3

#Limite de quantificação
summary(model)$coefficients[3]*10

detach(tabela)
rm(list = ls())

```

Fonte: autoria própria.