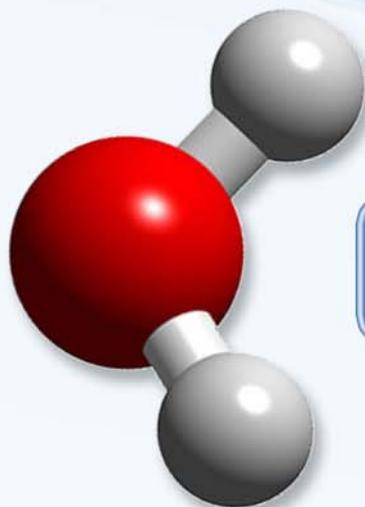


Conselho Regional de Química IV Região (SP)



Minicursos 2013

Análise instrumental - da amostragem à validação

Ministrante: Thais Vitória da Silva Reis

Doutorada em Química Analítica pelo IQ/USP, é coordenadora do curso Análise Instrumental Avançada da Faculdade Oswaldo Cruz

thais.vitoria@oswaldocruz.br

Santos, 13 de julho de 2013

Observação: A versão original desta apresentação, com slides coloridos, no formato PDF, está disponível na seção downloads do site do CRQ-IV (www.crq4.org.br)

Apoio



Conecte-se às redes
e saiba primeiro



[facebook.com/crqiv](https://www.facebook.com/crqiv)



twitter.com/crqiv



Sindicato dos Químicos,
Químicos Industriais e
Engenheiros Químicos
de São Paulo
www.sinquisp.org.br



M
i
n
i
c
u
r
s
o
s
-
2
0
1
3

ANÁLISE INSTRUMENTAL Da Amostragem à Validação

Qualidade e Confiabilidade nas Análises Químicas



Profa. Dra. Thais Vitória da Silva Reis

Contatos: tvsreis@gmail.com
thais.vitoria@rumosconsult.com

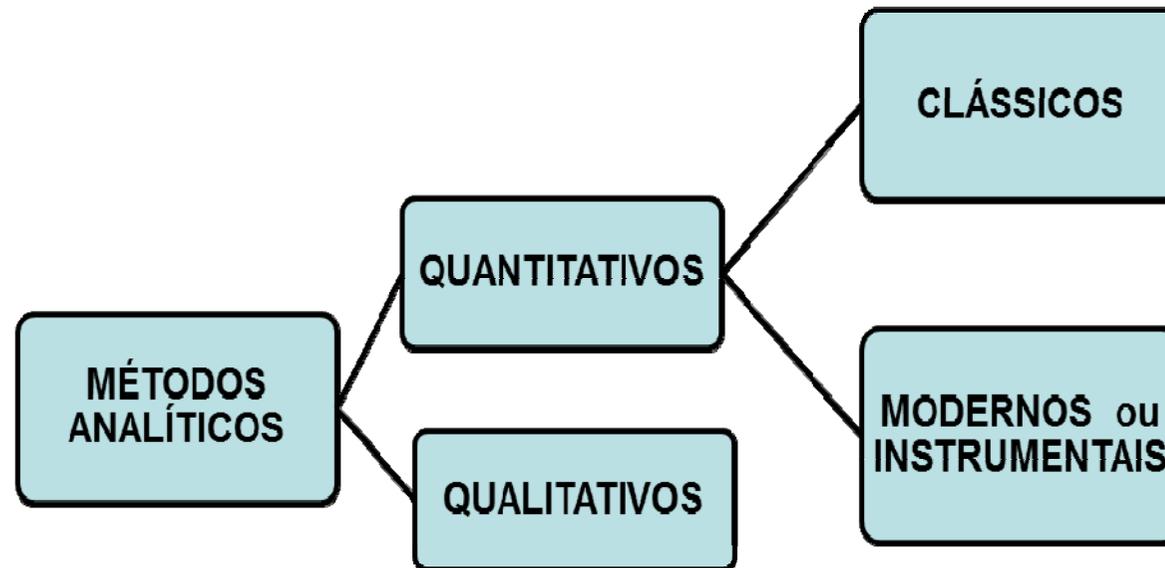


Conteúdos a serem desenvolvidos

- 1 - Utilização de Métodos Instrumentais;
- 2 - Classificação dos Principais Métodos analíticos Quantitativos;
- 3 - Desenvolvimento de Metodologia; Confiabilidade das Medidas
- 4 - Amostragem
- 5 - Validação de Amostragem e de Métodos Analíticos
- 6 - Medidas
- 7 - Validação de Amostragem e de Métodos Analíticos
- 8 - Fototransdução e Processamento de Informações na retina;
- 9 - Fundamentos da Espectroscopia Molecular nas Regiões de Visível e Ultra Violeta;
- 10 - Aplicações da Espectrofotometria de Visível e Ultra Violeta/Estudo de Casos.



Classificação dos Métodos Analíticos





Interação entre Métodos Analíticos e complementares





Desenvolvimento de Metodologia

Garantir confiabilidade de resultados experimentais

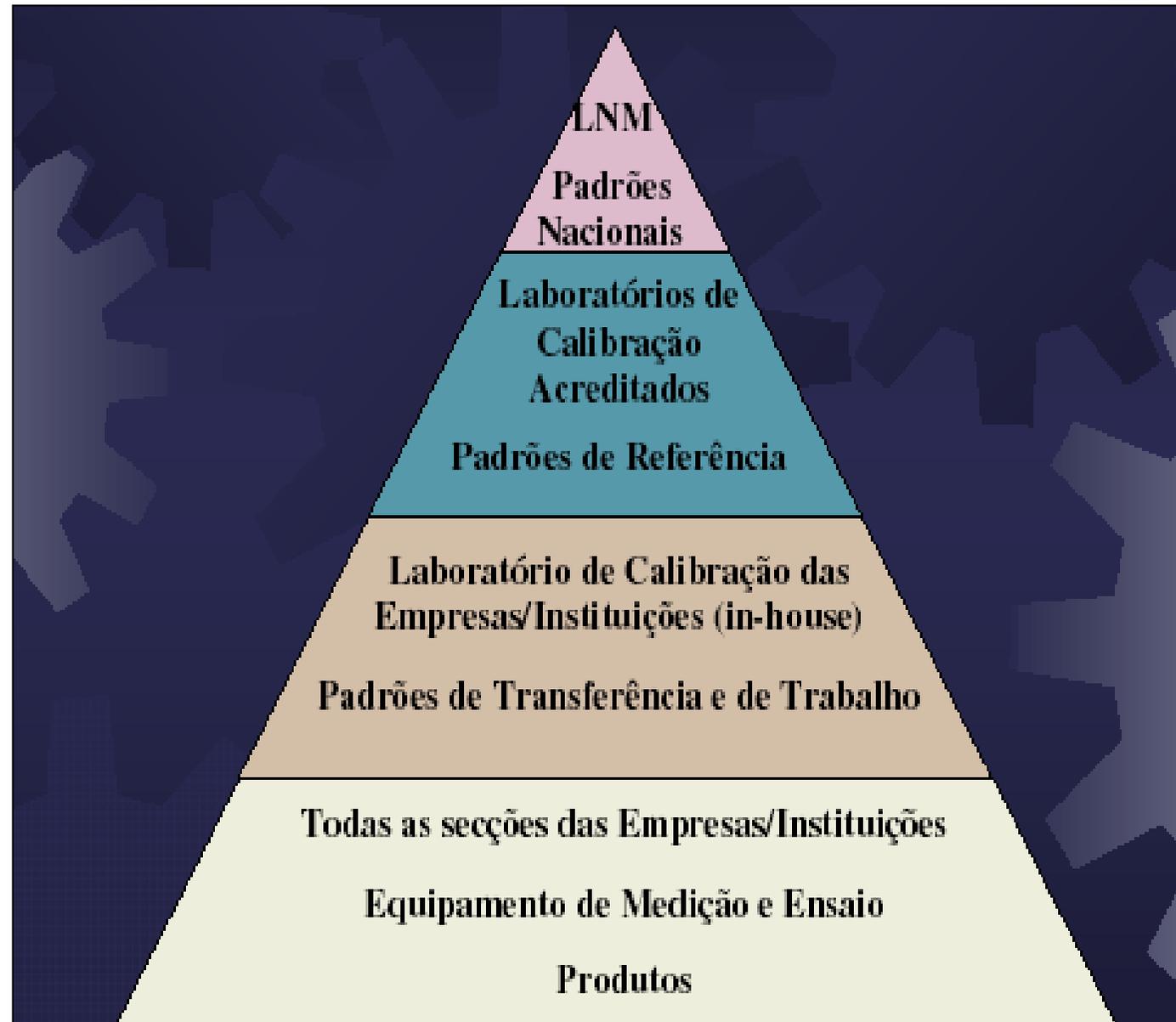
- Definir os objetivos da Qualidade dos Dados
- Que graus de precisão e exatidão são necessários?
- Qual a qualidade das Informações Desejadas?

- Pode-se selecionar o método analíticos para satisfazer os critérios:
 - Qualidade dos resultados
 - Limites de custo e disponibilidade de equipamentos

- Escolhido o Método, em geral otimizam-se os parâmetros de Operação:
- Planejamento Fatorial (Quimiometria)



Pirâmide de Rastreabilidade





Definindo alguns termos



- Último **Censo** de 2010
- População Brasileira 190.755.799 habitantes...logo :

Censo?

- Censo= Conjunto de dados obtidos de **todos** os membros da população



População?

- Coleção completa de todos os **elementos** (pessoas, medidas , idades...) = todos os sujeitos **a serem estudados**
- Logo, a população consiste no conjunto completo de brasileiros de todas as idades, etnias e do sexo fem. e masc.
- Atualmente há um superávit de 3.941.819 brasileiras.

96:100





Aleatorização e outras estratégias amostrais

“Caso os dados amostrais não sejam coletados adequadamente, eles poderão ser de tal forma inúteis que nenhuma manipulação estatística poderá salvá-los”.

Amostragens Mais Comuns:

- Aleatória: quando os membros de uma população são selecionados de tal modo que *cada membro individual* tem chance igual de ser selecionado.
- Aleatória Simples :de tamanho n é selecionada de modo que toda *amostra possível de mesmo tamanho n* , tem a mesma chance de ser escolhida.
- Amostra probabilística :envolve a seleção de membros de uma população de tal modo que os membros tenha uma chance conhecida (*mas não necessariamente igual*) de ser selecionado.



Amostragem aleatória: Cada membro da população tem igual chance de ser escolhido (computadores usados para gerar n° telefônicos aleatórios).

Amostragem Aleatória Simples uma amostra de n sujeitos é selecionada de forma que toda amostra possível de mesmo tamanho n tem a mesma chance de ser selecionada.

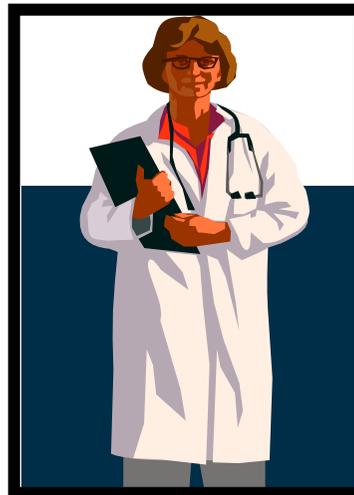


Amostragem de Conveniência usa resultados fáceis de coletar.





Amostragem Estratificada A população é subdividida em pelo menos dois subgrupos diferentes(ou estratos);os sujeitos dentro dos sub grupos tem as mesmas características(ex .sexo, faixa etária e a seguir se extrai uma amostra de cada sub grupo.



Dra. Thais Vitória da Silva Reis, p.11



Amostra por Conglomerado divide a população em seções (ou conglomerados) e a seguir seleciona aleatoriamente alguns destes conglomerados e escolhe todos os membros destes conglomerados.



Vacinar todos os habitantes destas ilhas.



Erros amostrais

- **Erro amostral** é a diferença entre o resultado amostral e o verdadeiro resultado da população (vem de flutuações amostrais devidas ao acaso).
- **Erro não amostral** - vem de dados amostrais coletados, registrados ou analisados incorretamente (instrumento não calibrado, seleção de amostra tendenciosa, cópia incorreta de dados).



Medidas de Centro

- É um valor no centro ou no meio do conjunto de dados:
- 1 - Média Aritmética

$$\text{Média} = \sum X/n$$

- $\sum X$ = soma de todos os valores amostrais
- $n = n^\circ$ de valores amostrais
- X = é a variável usada para representar valores individuais dos dados

Ex. Monitoração de Chumbo no Ar

A Agência de Proteção Ambiental Americana estabeleceu como padrão de qualidade no ar um limite máximo de $1,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

As medidas abaixo (em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no ar) foram tomadas no ed.5 do World Trade Center, em diferentes dias, logo após sua destruição pelos ataques terroristas de 11 de setembro de 2001:

5,40	1,10	0,42	0,73	0,48	1,10
------	------	------	------	------	------

- Calculando-se com a expressão acima (1-Média aritmética), $X_{\text{medio}}(\bar{x}) = 1,538 \mu\text{g}/\text{m}^3$.
- **5,40 = outlier ---- investigar**



2 - Mediana é a medida do centro, quando os dados amostrais estão em ordem crescente; é representada por “x til”.

Assim, para os dados da Monitoração de Pb teremos:

0,42 0,48 0,73 1,10 1,10 5,4

$$\text{Mediana} = (0,73 + 1,10) / 2 = 0,915$$

- Caso 5,40 fosse mantido
- Media = 1,538 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,
- Caso fosse alterado para 1,20... A média cairia para 0,838 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mas a mediana seria a mesma.
- *Ex. Inclua nos dados da monitoração o valor 0,66 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Ache Média e Mediana*



3 - Moda é o valor que ocorre mais frequentemente em um conjunto de dados.

-Quando dois valores ocorrem com a mesma maior frequência, o conjunto é chamado de **Bimodal**.

- Quando não se repete, **Não há Moda**.

- Esta modalidade de medida de centro é muito usada com dados no nível nominal de mensuração (nomes, rótulo, categorias)

Ex. Ache a Moda dos seguintes valores

a) 5,40 1,10 0,42 0,73 0,48 1,10

b) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

c) 35 35 35 67 67 67 98 99 99

4 - Ponto Médio é a medida de centro exatamente a meio caminho entre o valor máximo e o mínimo:

Ponto Médio= (valor Máximo+ valor Mínimo)/2



Medidas de variação

1-Amplitude é diferença entre o maior e o menor valor

Amplitude=(Valor Máximo – Valor Mínimo)

2- Desvio Padrão é um medida da variação dos valores em torno da média

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$



Química Analítica

Qualidade

Quantidade

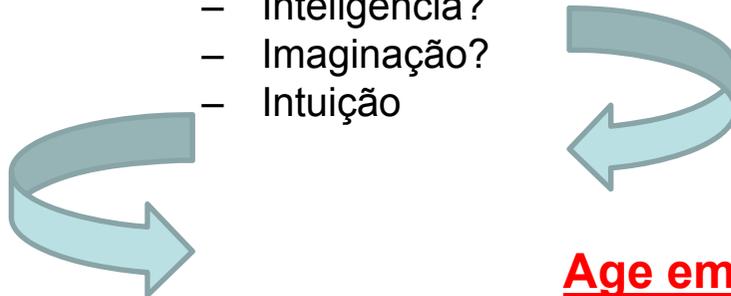
Estrutura



Qualitativa

- Estabelece a natureza dos componentes da amostra e a reproduz, aproximadamente.
- Quais atributos são essenciais ao analista químico?

- Inteligência?
- Imaginação?
- Intuição



Age em dois níveis:

- 1º** - Refere-se aos componentes da amostra sob a ótica da quantidade e da estrutura;
- 2º** - Refere-se a análise propriamente.



Qualidades do analista

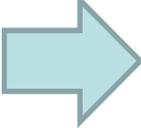


- Imaginação (necessária para a escolha das melhores condições da análise qualitativa completa)
- Inteligência (crítico para desenvolver experimentos com bons resultados)
- Flexibilidade
- (intuição+ imaginação+inteligência) assegura a confiabilidade

Dra. Thais Vilória da Silva Reis, p.20



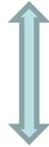
1 - Amostragem

- Passo mais importante para obtenção do resultado final
- 
- Buscar confiabilidade do resultado
 - 30% dos erros vêm da amostragem
 - **Operação de coleta de amostra representativa para a análise do universo amostral**
- 
- Como Amostrar?
 - Onde Amostrar?
- 
- Como preservar a amostra?

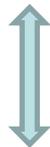


Diferenciação entre Amostrar e Coletar

- Amostrar (estudo para a tomada da amostra)



- Preparação
- Equipamentos
- Representatividade dos pontos
- Pessoas envolvidas



- **Não existe amostra Significativa apenas representativa**

- Coletar



- Ato de pegar
- Isolar
- Tomar uma alíquota



Análise: resíduo agroquímico em plantação de abóboras

- N° de plantas com frutos 500.0000
- **1-Tamanho do Universo Amostral:**
1 aboboreira ocupa 4m²



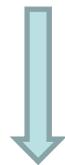
2 milhões de m² são necessários para a plantação de 500.000 plantas.





2 - Qual a porção de abóboras que deve ser coletada da plantação?

- Fruto mais maduro
- Fruto mais verde
- Da parte mais sombreada pelas folhas
- Da parte mais exposta



Decidida esta etapa, então é só coletar, mas....

3 - A coleta:

Quantas coletar?

1 saco?

1 caminhão?

4 - No Laboratório:

- Qual porção tomar?

5 - Aspectos da amostragem

- Figura do amostrador
- Quanto amostrar
- A concentração a ser analisada
- Como amostrar
- Os métodos envolvidos na análise e a validação



Conclusões

- Na amostragem: **não existe lote homogêneo.** Portanto, é impossível tirar uma alíquota que signifique o universo amostral
- Logo, **não há possibilidade** de se obter amostra significativa
- Em virtude da heterogeneidade, só podemos ter uma amostra, no máximo **Representativa** do universo amostra!
- Mesmo tomando a melhor amostra representativa, haverá necessidade **de torná-la disponível analiticamente!** (passar por uma preparação)





Preservação da amostra (evitar que a amostra se altere)

- Alterações da amostra podem ser:

- FÍSICAS:

- PÓ



- HIGROSCOPICIDADE

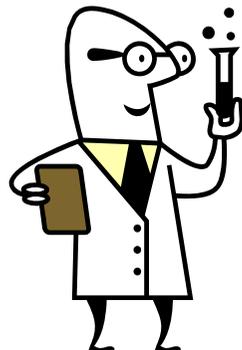
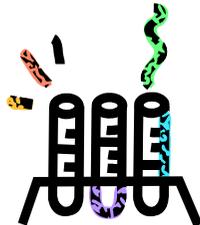


- CONTAMINAÇÃO POR TOQUE OU EMBALAGENS

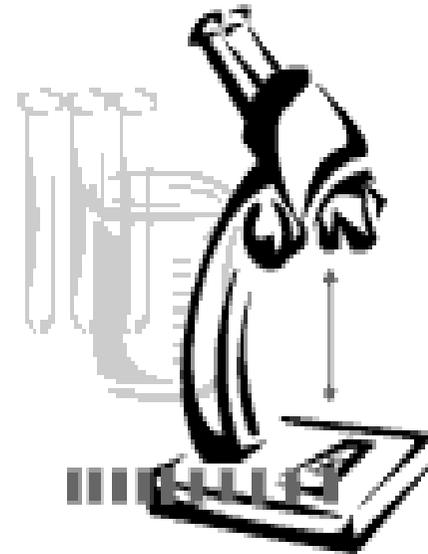




- **QUÍMICAS:**
 - Reações químicas
 - Ação de luz sobre moléculas



- **BIOLÓGICAS:** ação de bactérias





Como preservar? Resguardar as condições da amostra

- Resguardar as condições da amostragem
- Evitar poeira
- Cuidar da embalagem
- Cuidar da estocagem
- Isolar a espécie analisada de contaminantes
- Reduzir a cinética química (diminuir T)
- Reduzir luz para substâncias fotossensíveis (evita também crescimento de alguns micro-organismos) (uso de frascos âmbar)
- Evitar contaminação contato da pele
- Diminuir quantidade de oxigênio para amostras oxidáveis (Trabalhar a vácuo ou atm de nitrogênio)
- Diminuir grau de umidade , evitando presença de água em substâncias higroscópicas ou ação de crescimento de micro-organismos (usar dessecador, desumidificador)





Validação da amostragem é possível?

SIM....

Variáveis:

1. Método analítico para sólidos...

Problema=pesagem

2. Amostragem

Problema=variabilidade do tamanho de partículas

Quando será aplicável?

Quando:

- *Tomada de amostra a ser levada ao lab (maior dificuldade)*
- *Tomada de amostra a ser analisada Amostras de 1 L petróleo representativa de milhões de barris/dia
.....1L de
Água de estação de tratamento* 
amostradores e analisadores contínuos



Regras válidas para esta validação

- Aplicar estimativas de variância e desvio padrão
- Usar lotes que permitam a representatividade
- Regras de rejeição para quantidades máxima de valores
- 5-10 tomadas de amostra

- Classificar a amostragem em categorias:
 - 1 - RENOVÁVEIS
 - 2 - NÃO RENOVÁVEIS
 - 3 - SAZONAIS
 - 4 - ASSEGURADAS
 - 5 - COMPLEXAS



Categorias de Amostragem

CATEGORIA	ESPECIFICAÇÃO DA AMOSTRA	CARACTERÍSTICAS
1	RENOVÁVEIS	NÃO FICAM MARCAS DA COLETA; HÁ RENOVAÇÃO Ex. Rios, processos industriais contínuos, fontes
2	NÃO RENOVÁVEIS	DEIXAM MARCAS DE COLETA Ex. Solo, madeira, amostras forenses, processos descontínuos
3	SAZONAIS	VARIAM COM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS, OU OUTRAS VARIÁVEIS Ex. Plantas, folhas, frutos, carnes
4	ASSEGURADAS	TEM QUALIFICAÇÕES DETERMINADAS(NORMAS OU HISTÓRICO) Ex. lotes de matéria prima, produto acabado, produtos de prateleira
5	COMPLEXAS	HÁ DIFICULDADE NA IDENTIFICAÇÃO Ex. amostras com alteração de cor/odor/ sabor; de escala micro



Validando a amostragem

AMOSTRAS LÍQUIDAS

- RESPEITAR:
 - **Representatividade**
 - Ex.Lençol freático;em rios - fluxo , central, lateral, caminhos preferenciais

AMOSTRAS SÓLIDAS

- RESPEITAR:
 - **Representatividade**
 - Ex.Processos industriais(batelada ou contínuo)
 - Produtos dispersados em solo (nº pontos em função da área e profundidade(30-60 cm)

AMOSTRAS GASOSAS

- RESPEITAR:
- **Garantir boa coleta**
- Evitar perdas (vazamentos ou evaporação);
- calibrar equipamentos de medida de vazão;
- amostrar com mesma velocidade de fluxo



Erros de amostragem

Considerando SÓLIDOS HETEROGÊNEOS
a precisão será:

$$S_T = (S^2_S + S^2_A)^{1/2}$$

Onde

S^2_A estimativa da variância da análise

S^2_S estimativa da variância da amostragem

S_T estimativa do desvio padrão

Exemplo

- Erro de amostragem suposto=3%
- Erro analítico=1%
- $S_T = (3^2 + 1^2)^{1/2}$
 $S_T = \pm 3,16\%$



Validação em Análise Químicas

Validação do Método:

Processo que prova que um método analítico é aceitável para os propósitos a que se destina.



Figuras de Mérito da Validação:

- **1 - Especificidade:** capacidade do método de distinguir o analito de todo o resto que se encontra na amostra; adiciona-se deliberadamente impurezas para testar a especificidade;
- **2 - Linearidade:** mede o quanto o gráfico da resposta analítica contra a concentração (ou quantidade do analito) segue uma linha reta (quadrado do coeficiente de correlação acima de 0,995);
- **3 - Exatidão:** É a proximidade do valor verdadeiro; pode ser verificada por análise de um material de referência ou mais métodos analíticos diferentes que são comparados dentro da precisão de cada um; por análise de um branco que é propositadamente contaminado com quantidade de analito conhecida; por adições de padrão de analito à amostra.



- **4 - Precisão:** É a reprodutibilidade de um resultado.
- **Precisão Intrínseca do Ensaio:** uma pessoa analisa várias alíquotas de um material homogêneo no mesmo dia de trabalho. Cada análise é independente e assim a precisão intrínseca do ensaio expressa o quão reprodutível pode ser o método.
- **Precisão Intermediária ou Robustez:** diferentes pessoas, em dias diferentes e em instrumentos diferentes analisam a mesma amostra, no mesmo laboratório (cada análise pode usar reativos diferentes, preparados independentemente);
- **Precisão Interlaboratorial:** alíquotas da mesma amostra são analisadas em diferentes dias, com equipamentos diferentes, com reagentes de cada laboratório, por diferentes pessoas (medida mais geral da reprodutibilidade);



5 - Faixa: Intervalo de Concentrações onde Linearidade, precisão e Exatidão são aceitáveis.

Testes Utilizados:

**1-Determinação do Limite de Confiança da Média
(teste t-Student)**

$$\mu = \bar{x} \pm t. s / \sqrt{N}$$



Valores do Parâmetro t-Student em função do Número de Determinações para 95% e 99% de probabilidade

Graus de Liberdade(N-1)	95% de Probabilidade	99% de Probabilidade
1	12,71	63,66
2	4,30	9,93
3	3,18	5,84
4	2,78	4,60
5	2,57	4,03
6	2,45	3,71
7	2,37	3,50
8	2,31	3,36
9	2,26	3,25
10	2,23	3,17
11	2,20	3,11
12	2,18	3,06
13	2,16	3,01
infinito	1,96	2,58



Rejeição de Resultados (teste Q)

Caso $Q_{\text{calc}} > Q_{\text{tab}}$ o valor é rejeitado

Valores Críticos do quociente Q para diferentes Limites de Confiança

Número de Observações(N)	Q 95%	Q 99%
2	-	-
3	0,970	0,994
4	0,829	0,926
5	0,710	0,821
6	0,625	0,740
7	0,568	0,680
8	0,526	0,634
9	0,493	0,598
10	0,466	0,568



Teste F (para comparar conjunto de dados)

Por convenção o maior valor de variância é colocado no numerador.

$$F = s^2_x / s^2_y$$

Quando $F_{exp} > F_{tab}$, a diferença em variância(ou precisão) é tida como significativa

Valores Críticos de F para o Nível de 95%

Graus de Liberdade (Numerador)

Graus de Liberdade (denominador)	3	4	5	6	12	20	infinito
3	9,28	9,12	9,01	8,94	8,74	8,64	8,53
4	6,56	6,39	6,26	6,16	5,91	5,80	5,63
5	5,41	5,19	5,05	4,95	4,68	4,56	4,36
6	4,76	4,53	4,39	4,28	4,00	3,87	3,67
12	3,49	3,26	3,11	3,00	2,69	2,54	2,30
20	3,10	2,87	2,71	2,60	2,28	2,12	1,84
infinito	2,60	2,37	2,21	2,10	1,75	1,57	1,00



Critérios para utilização de métodos instrumentais com confiança

Rastreabilidade

Propriedade de um resultado de medição ou valor de padrão estar relacionado às grandezas estabelecidas (padrões internacionais) através de cadeia contínua de comparações tendo todas as incertezas estabelecidas

- 1 - Calibração do equipamento** rastreada com padrões apropriados (material de referência=subst. Pura /SI);
- 2 - Método Primário de Medição** (rastreado diretamente ao SI ...menor incerteza com respeito à referência);
- 3 - Utilizando Materiais de Referência** (MR) da subst. Pura (adição de padrão);
- 4-Medição de Material de Referência Certificado (MRC)** ..compara-se os resultados vs. uma matriz certificada (reduz incerteza);
- 5-Medição usando procedimento aceito** (baseado em norma nacional ou Internacional).



Aplicações dos testes T, Q e F

1 - Na determinação de cobalto em uma amostra, por método espectrofotométrico, obtiveram-se as seguintes porcentagens do elemento: 21,44;21,42;21,36;21,39;21,7;22,9.

Verifique se haverá rejeição de resultados para um nível de 95% de confiança e, após calcular o desvio padrão, apresente o intervalo onde deve estar a média da população com um grau de confiança de 95%.

2 - Ao avaliar a qualidade de um novo laboratório de análises, foram feitas no mesmo 6 determinações de cobalto em Sulfato de Cobalto, tendo-se encontrado uma média de 35,25% m/v de Co com desvio padrão de 0,34%.

O laboratório de referência obteve uma média de 35,35% de Co com desvio padrão de 0,25% em 5 determinações.

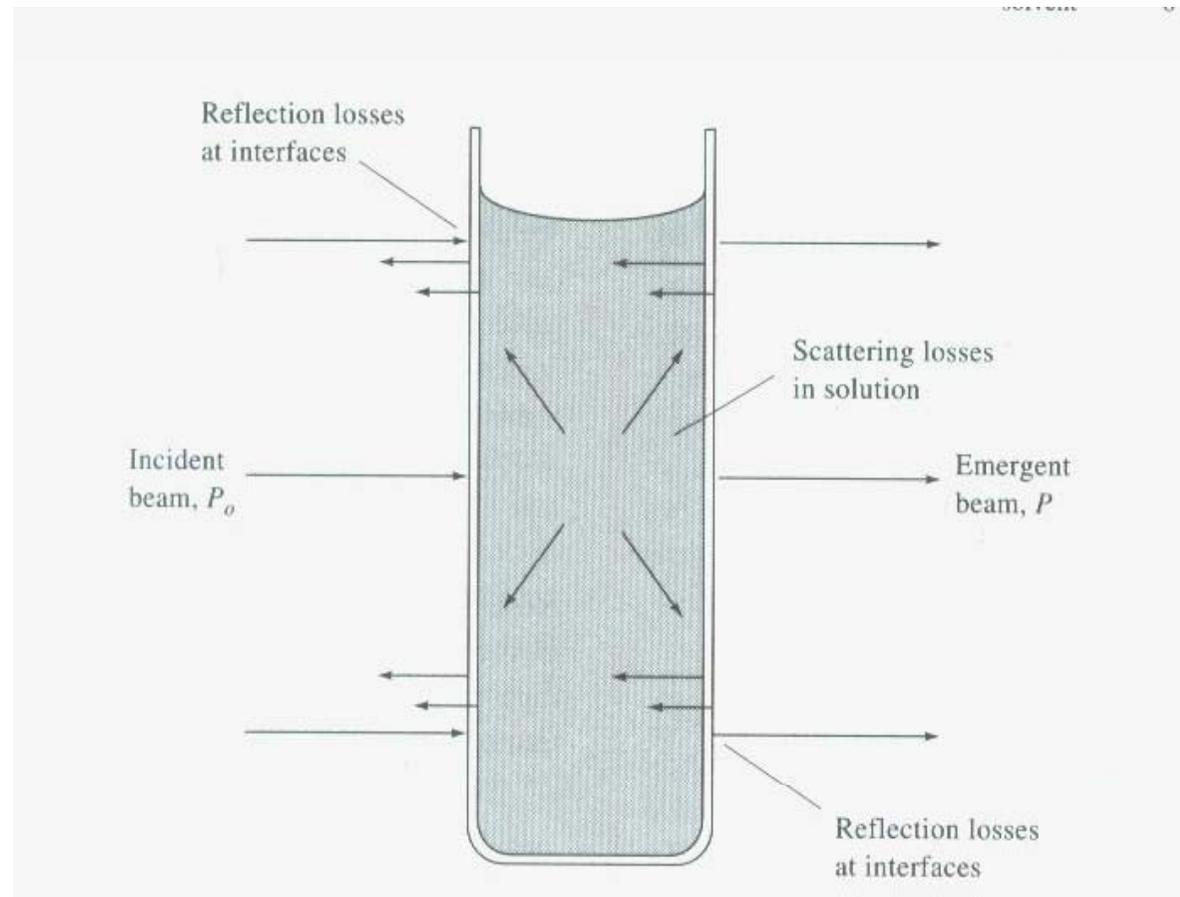
Há diferença significativa entre os resultados dos laboratórios envolvidos a um nível de 95% ?



Validando na Espectrofotometria UV /Vis

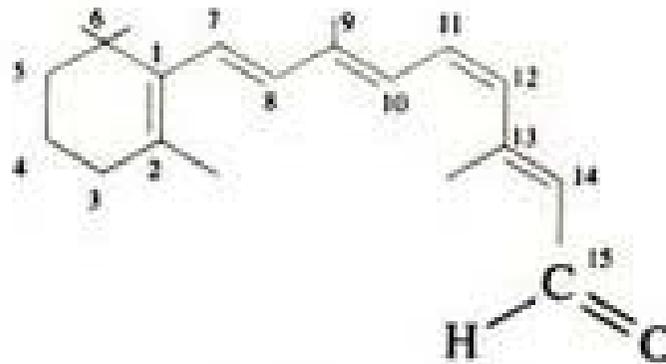
Atenuação do Feixe

Nas interfaces: ar/parede; parede /solução;
Como resultado de espalhamento por moléculas grandes; por
absorção das paredes da célula

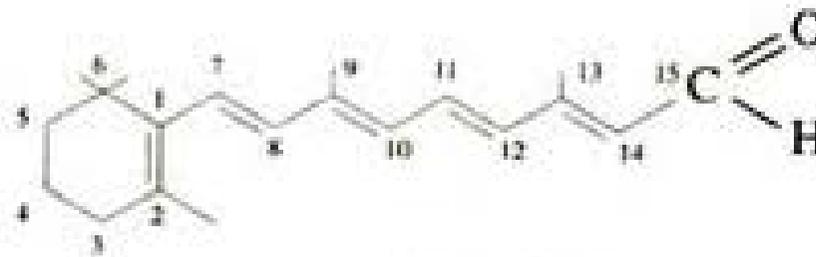




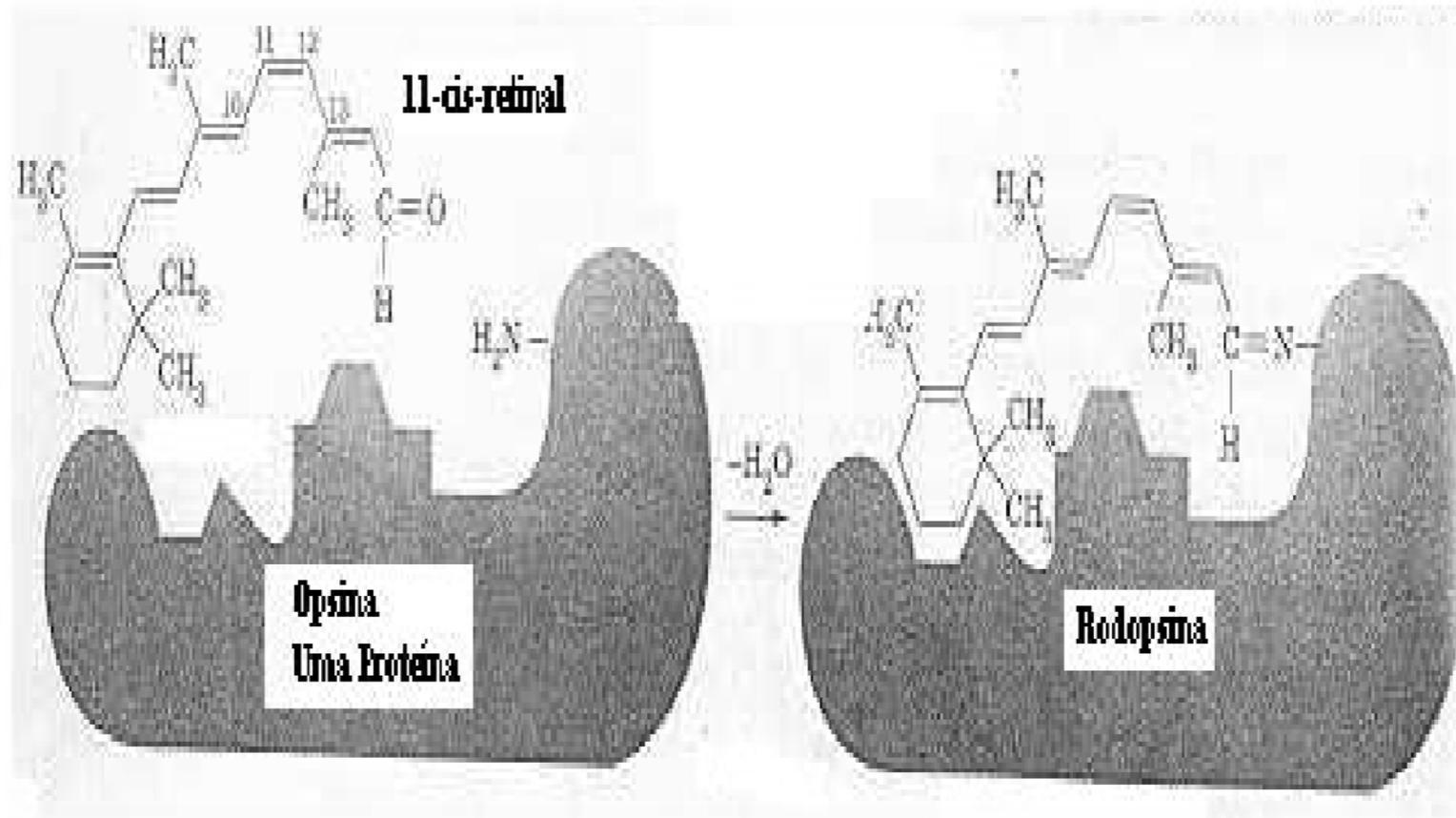
Fototransdução e processamento de informações na retina

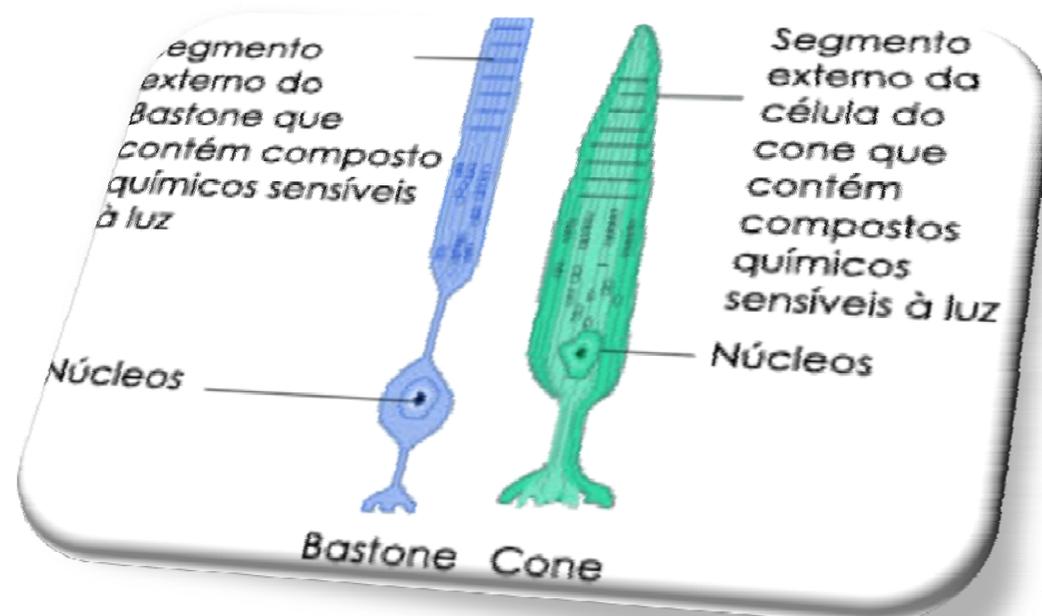
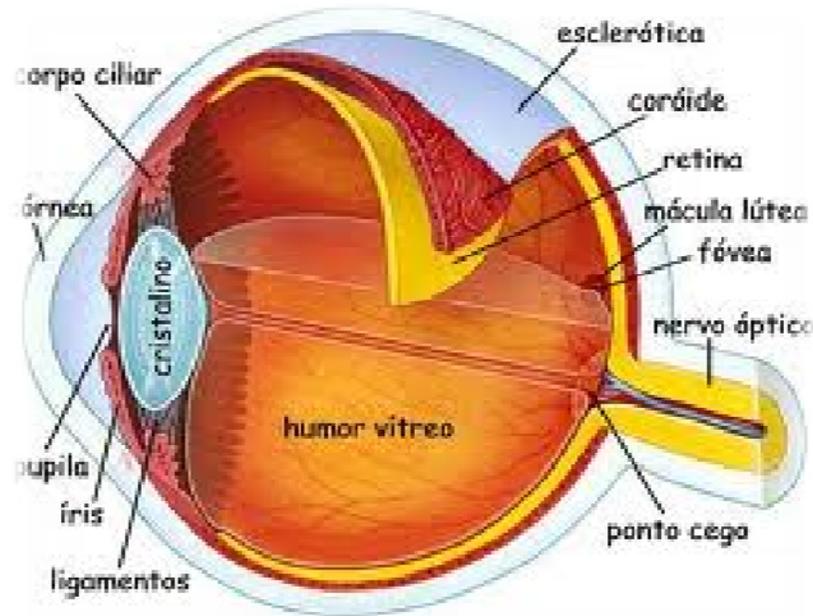


cis-11-retinal



trans-11-retinal







M
i
n
i
c
u
r
s
o
s
-
2
0
1
3

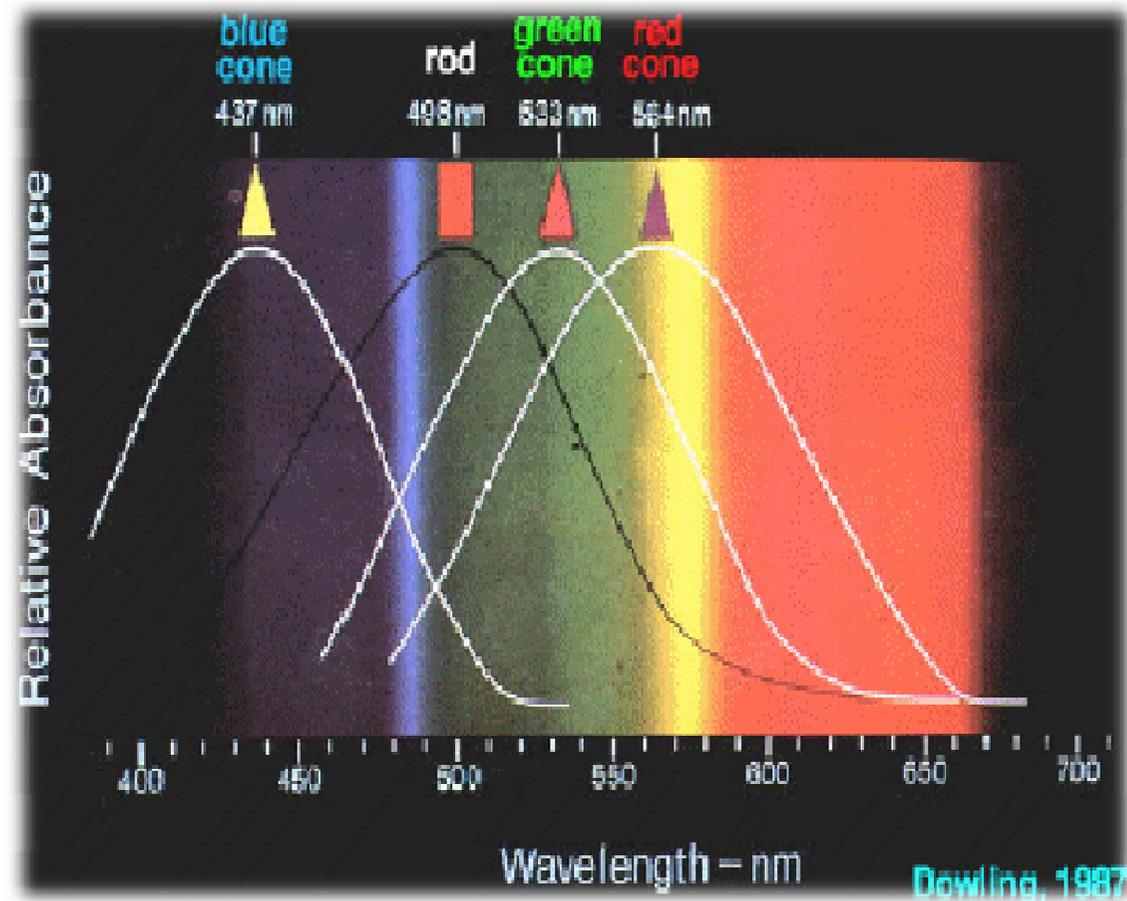
teste sua habilidade



Dra. Thais Vilória da Silva Reis, p.47



Fototransdução e processamento de informações na retina



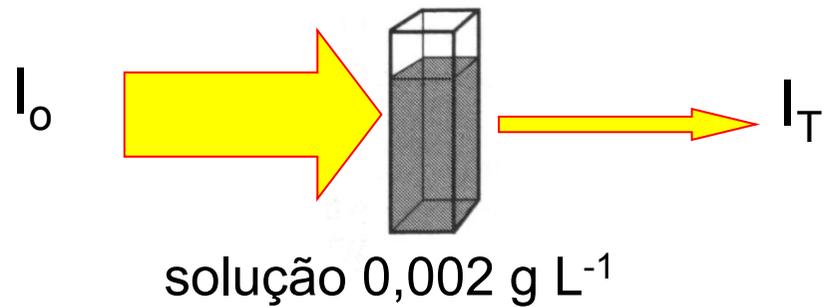
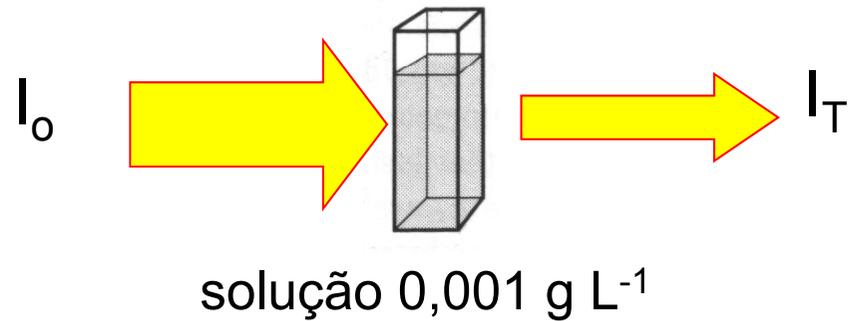


Espectro Eletromagnético nas Regiões de Visível e Ultra Violeta



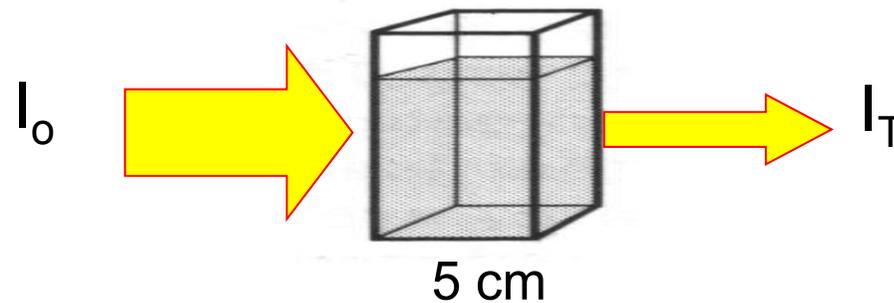
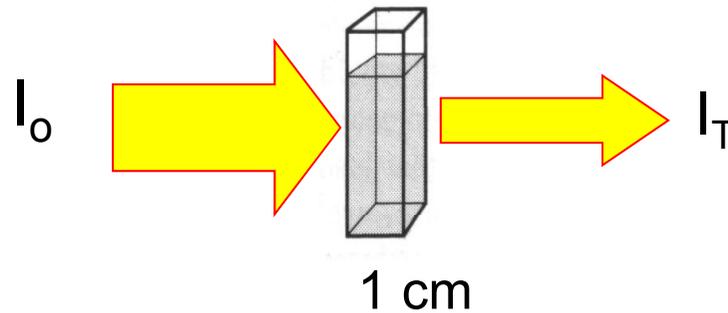


INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO

$$A = \epsilon \times b \times c$$


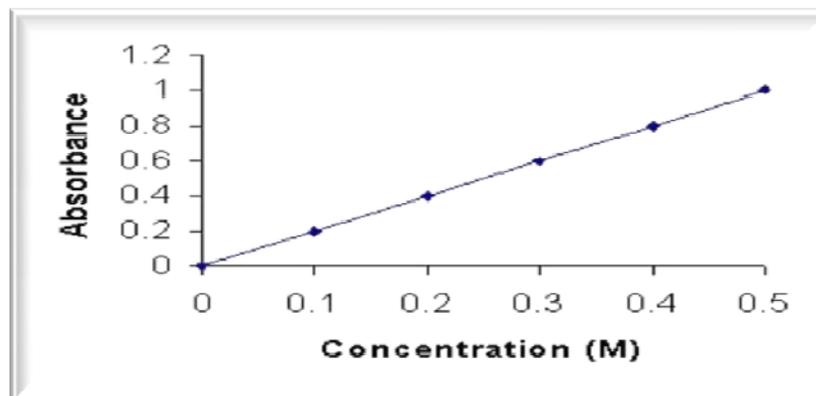
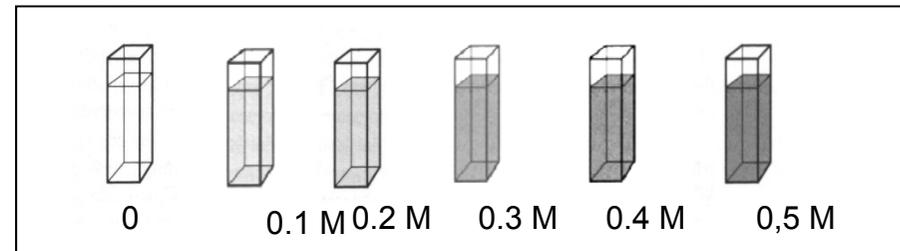
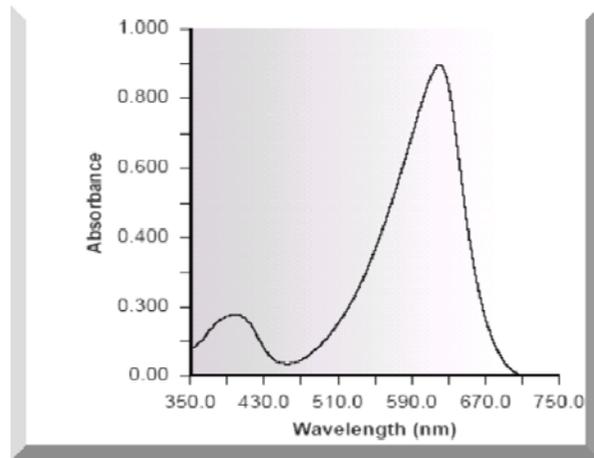


INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DA CÉLULA

$$A = \epsilon \times b \times c$$




Espectro de Absorção e Curva de Calibração



Dra. Thais Vilória da Silva Reis, p.52



Dinâmicas em sala:

Aplicações do Método

- 1 - Determinação de uma espécie absorvente
- 2 - Determinação simultânea de íons

Estudo de caso:

- 1 - Otimização e validação de Método Analítico Volumétrico para Quantificação do Carbonato de Cálcio;
- 2 - Caracterização e Quantificação de Contaminantes em aguardente de cana

Diferenciação entre Protocolos e Relatórios



Aplicações da Espectrofotometria de Visível e Ultra Violeta

- **1** - Determinado composto apresentou absorvidade molar de $2,17 \cdot 10^3 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Que concentração do composto será necessária para produzir uma solução em célula de 2,5 cm? %T=36,8.
- **2** - Uma solução contendo um complexo de tiouréia e Bi(III) apresentou absorvidade molar de $9,32 \cdot 10^3 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ a 472 nm.
- **a)** Qual a absorvância de solução de $6,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do complexo á 472 nm em célula de 1 cm de espessura?
- **b)** Qual a %T descrita em (a) ?
- **c)** Qual a concentração molar do complexo na solução que tem absorvância descrita em (a) quando medida em célula de 3 cm?



3 - Uma alíquota de 25 mL de solução aquosa de quinino foi diluída a 50 mL e encontrou-se a 348 nm uma absorvância de 0,832, quando medida em célula de 2 cm.

Uma segunda alíquota de 25 mL foi misturada a 10 mL de solução contendo 28 ppm de quinino.

Após diluição a 50 mL, a solução apresentou Absorvância de 1,22, em célula de 2,00 cm.

Qual a concentração de quinino na amostra?



4 - Ti e V formam complexos coloridos com água oxigenada. Soluções separadas destes metais, contendo 5 mg dos mesmos, foram tratadas com ácido perclórico e água oxigenada e diluídas a 100 mL.

Uma terceira solução foi preparada, dissolvendo-se 10 mg de uma liga (que contem apenas Ti e V) e tratada de mesma forma que os padrões.

As absorbâncias das três soluções foram medidas em 410 e 460 nm.

Calcule as %T de Ti e de V na liga.

solução	A 410 nm	A 460 nm
Ti	0,760	0,513
V	0,185	0,250
Liga	0,715	0,657



REFERÊNCIAS

- 1-SKOOG,D.A.;Holler,F,J, and Nieman,T.A. *Principles of Instrumental Analysis . .5Th Ed.Harcourt. Brace & Company.USA, 1998.*
- 2-HARRIS,D.C. *Análise Química Quantitativa.6ª Ed.LTC Ed.Rio de Janeiro,2005.*
- 3-BASSET,J.;Denney,R.C.;Jeffery,G.H.;Mendham,J. *Vogel-Análise Inorgânica Qualitativa Ed. Guanabara II,,Rio de Janeiro 1978.*
- 4.OHLWEILLER,O.A.*Fundamentos de Análise Instrumental.Rio de Janeiro, LTC Ed.,1981.*
- 5-GONÇALVES,M.L.S.S.*MÉTODOS Instrumentais para Análise de Soluções.3ª Ed.FUNDAÇÃO CALOUSTE Gulbenkian,Lisboa,1996.*
- 6-DOQ-CGCRE-008 rev03,fev **2010-Orientação sobre validação de Métodos Analíticos**.INMETRO.
- 7-Resolução .Res nº 899,29/05/2003**Guia para Validação de métodos analíticos e Bioanalíticos**.ANVISA.
- 8-PINTO,T.J.;FERRARINI,M.;GATTI,R.M.*Proposta para Roteiro Prático para Validação de Métodos Analíticos.* Farm. e Quím.SP,v.36.p26-36,2003.
- 9-Acta Farm.Bonaerense 25(2): 262-6(2006)
- 10-TRIOLA,M.*Introdução á Estatística* .TCT,RJ, 2008
- 11-LEITE,F.*Amostragem fora e dentro de Laboratório*, Campinas,Ed Atomo 2005
- 12-_____ *Validação em Análise Química* .Campinas, Ed Atomo1998
- 13Levine, DM et alli *Estatística Teoria e Aplicações.*%ª Ed. RJ LCT 2008



M
i
n
i
c
u
r
s
o
s
-
2
0
1
3

Anexos

Artigos Científicos para Atividades em Classe

Dra. Thais Vilória da Silva Reis, p.58

Validação

Dra. Thais Vitória da Silva Reis

Diferenciação entre Protocolos e Relatórios

Fonte: GUIAS RELACIONADOS À GARANTIA DE QUALIDADE; Gerência de Inspeção e Certificação de Insumos, Medicamentos e Produtos – GIMEP; www.anvisa.gov.br

Validação Prospectiva

Os **fatores/parâmetros críticos** que podem afetar a qualidade do produto acabado devem ser **determinados durante a fase de desenvolvimento do produto**. Para isso, o processo produtivo deve ser “quebrado” em fases, a fim de que cada fase seja avaliada individualmente. A criticidade desses fatores deve ser determinada através do desafio do “pior caso”, quando possível.

A Validação Prospectiva deve ser realizada de acordo com o **Protocolo de Validação**, que deve incluir:

- (a) **descrição do processo;**
- (b) **descrição do experimento;**
- (c) **detalhes** do equipamento/instalação a ser usado, juntamente com seu *status* de qualificação/calibração;
- (d) **variáveis a serem monitoradas;**
- (e) **amostras a serem tiradas** – onde, quando, como e quanto;
- (f) características/atributos de desempenho do produto a serem monitorados, juntamente com os métodos de teste;
- (g) **limites aceitáveis;**
- (h) **cronogramas;**
- (i) **responsabilidades do pessoal;** e
- (j) detalhes sobre os métodos para registro e avaliação dos resultados, incluindo análises estatísticas.

Validação Concorrente

Em certos casos, é adequado **validar um processo durante sua produção de rotina, por exemplo, no caso de diferentes concentrações do mesmo produto**, tendo sido uma delas validada anteriormente, e ainda nos casos de diferentes formas de comprimidos ou processos bem conhecidos.

É essencial que os sistemas e equipamentos a serem utilizados durante a validação tenham sido corretamente qualificados anteriormente.

A documentação necessária é a mesma daquela especificada na validação prospectiva

Validação Retrospectiva

A validação retrospectiva é **baseada na revisão histórica de dados** a fim de fornecer evidências documentadas de que o desempenho do processo objeto do estudo seja aquele esperado. Esse tipo de validação ainda requer a preparação de protocolos, relatórios contemplando resultados dos dados revisados, conclusão e recomendações.

A validação retrospectiva não é o método de escolha para estudos de validação de processo,

e deverá ser utilizada apenas em casos excepcionais. A escolha desse tipo de estudo somente será aceitável para processos bem conhecidos, no entanto, é inadequada quando houver ocorrido mudanças recentes na composição do produto, nos procedimentos de produção ou em equipamentos utilizados.

Os resultados devem ser documentados no **Relatório de Validação**. Devem conter, no mínimo:

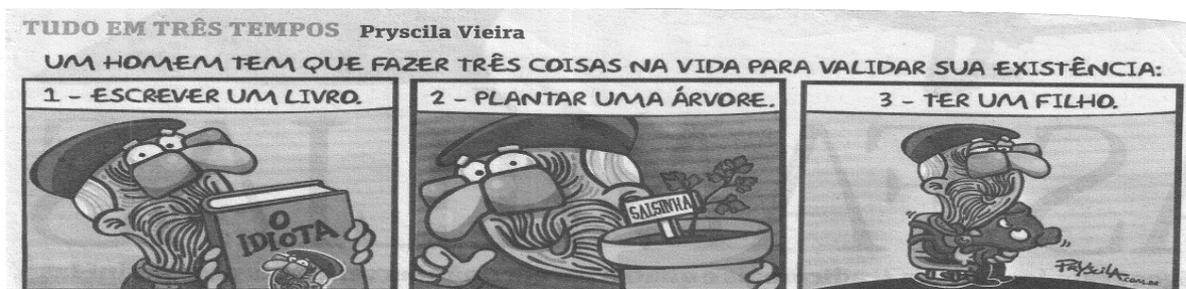
- (a) **uma descrição do processo** – Ordem de Produção/Embalagem, incluindo detalhes das etapas críticas;
- (b) **um sumário detalhado dos resultados** obtidos no controle em processo e no produto final, incluindo dados fora das especificações. Quando os dados brutos não fizerem parte do documento, referenciar suas fontes e mencionar onde podem ser encontrados;
- (c) qualquer **trabalho adicional** necessário durante a atividade de validação que não conste no protocolo ou qualquer desvio observado deve ser formalmente contemplado no relatório com sua respectiva explicação;
- (d) **uma revisão e comparação** com os resultados esperados;
- (e) **uma aceitação/rejeição do trabalho** por parte da equipe/pessoa designada como responsável pela validação depois de qualquer ação corretiva ou retrabalho.



e deverá ser utilizada apenas em casos excepcionais. A escolha desse tipo de estudo somente será aceitável para processos bem conhecidos, no entanto, é inadequada quando houver ocorrido mudanças recentes na composição do produto, nos procedimentos de produção ou em equipamentos utilizados.

Os resultados devem ser documentados no **Relatório de Validação**. Devem conter, no mínimo:

- (a) **uma descrição do processo** – Ordem de Produção/Embalagem, incluindo detalhes das etapas críticas;
- (b) **um sumário detalhado dos resultados** obtidos no controle em processo e no produto final, incluindo dados fora das especificações. Quando os dados brutos não fizerem parte do documento, referenciar suas fontes e mencionar onde podem ser encontrados;
- (c) qualquer **trabalho adicional** necessário durante a atividade de validação que não conste no protocolo ou qualquer desvio observado deve ser formalmente contemplado no relatório com sua respectiva explicação;
- (d) **uma revisão e comparação** com os resultados esperados;
- (e) **uma aceitação/rejeição do trabalho** por parte da equipe/pessoa designada como responsável pela validação depois de qualquer ação corretiva ou retrabalho.



**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AGUARDENTES DE CANA****Lidiany Mendonça Zacaroni, Maria das Graças Cardoso,* Adelir Aparecida Saczk, Wilder D. Santiago e Jeancarlo Pereira dos Anjos**

Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

José Masson e Felipe C. Duarte

Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

David Lee Nelson

Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 26/1/10; aceito em 27/8/10; publicado na web em 24/11/10

ANALYSIS OF ORGANIC CONTAMINANTS AND COPPER IN CACHAÇA. The objective of the present study was the evaluation of the presence of organic and inorganic contaminants in samples of aged cachaça from the South of the state of Minas Gerais. Furfural, methanol and copper were determined by colorimetric reactions, while the analyses of ethyl carbamate and acrolein were performed by GC/MS and HPLC, respectively. High levels of furfural and copper were obtained. All samples showed concentrations below the established by legislation for the ethyl carbamate, and for acrolein, only one sample showed higher levels. Methanol was not detected in the samples.

Keywords: beverage; contaminants; wood.

INTRODUÇÃO

De acordo com o Decreto nº 4851 de 2003 e com a Instrução Normativa nº 13 de 30/6/ 2005, aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v à 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressas em sacarose. A cachaça, entretanto, foi definida como sendo a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% v/v à 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose.^{1,2}

As bebidas alcoólicas fermento-destiladas distinguem-se uma das outras pela presença de componentes secundários que irão formar um “buquê” característico de cada bebida. Esses componentes secundários se formam juntamente com o álcool etílico durante o processo de fermentação do mosto, mudam de caráter e proporção durante a destilação, havendo uma posterior maturação do produto.^{3,4} No entanto, alguns compostos são indesejáveis à bebida devido, principalmente, as suas propriedades tóxicas, cancerígenas e características que depreciem a qualidade do produto final.

Devido à complexidade da composição química da cachaça esta é dividida em fração orgânica e inorgânica. A primeira é constituída basicamente de alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, carbamato de etila e compostos sulfurados. Dependendo do teor e dos compostos presentes, a bebida pode ser classificada como desejável ou não, em relação à aceitação sensorial, ou em tóxica e não tóxica, em relação à saúde. A fração inorgânica é constituída principalmente por íons metálicos, tais como alumínio, cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, etc.⁵

A legislação brasileira, Decreto nº 2314 de 04/09/1997 estabelece o limite máximo de cobre em 5 mg/L de produto.⁶ No entanto, no

mercado internacional o limite máximo estabelecido é de 2 mg/L tornando-se, assim, um entrave para as exportações da bebida.⁷ Embora nesta concentração o cobre não possa ser considerado como tóxico, a sua presença contribui para ressaltar o sabor ácido na bebida, além de facilitar os processos oxidativos devido à presença de íons cobre (II).

O metanol é um álcool indesejável na bebida, devido a sua alta toxicidade. Ele origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação.^{4,8}

O furfural, aldeído cuja presença é indesejável na bebida, resulta da decomposição química de carboidratos. Pode ser formado em diferentes etapas do processo de produção da cachaça, tais como pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou mesmo durante o envelhecimento da bebida por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida.⁹⁻¹³

A acroleína, também conhecida como 2-propenal, é uma substância carcinogênica oriunda do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana.^{8,14} É uma substância extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos.^{15,16} Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta, podendo associar sua presença ao aroma de pimenta das bebidas.¹⁷

O carbamato de etila, substância altamente carcinogênica, é um contaminante orgânico, cuja quantificação em aguardentes de cana passou a ser exigida a partir de junho de 2010. É encontrado naturalmente em baixas concentrações, em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. Sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que originam da degradação de aminoácidos, outros que venham de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta.¹⁸⁻²⁰

*e-mail: mcardoso@dqi.ufla.br

O presente trabalho objetivou avaliar a presença de contaminantes orgânicos (furfural, metanol, carbamato de etila e acroleína) e inorgânicos (cobre) em aguardentes de cana da região Sul de Minas Gerais.

PARTE EXPERIMENTAL

Doze amostras de aguardentes de cana foram coletadas na região sul do Estado de Minas Gerais. As análises físico-químicas (grau alcoólico, metanol, furfural e cobre) foram realizadas segundo parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005 do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Reagentes

Os reagentes empregados para análise foram permanganato de potássio, ácido cromotrópico, 2,4-dinitrofenil-hidrazina 99% (2,4-DNPH), bissulfato de sódio, ácido acético, anilina, ambos da Vetec; carbamato de etila 97% e acroleína 99% da Acros Organics; metanol e acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker); água ultrapura, ácido sulfúrico e etanol absoluto da Merck.

Carbamato de etila

O método empregado para a quantificação do carbamato de etila foi o CG/EM no modo de monitoramento de íons seletivos (SIM). Para as análises, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas (QP5050A), ambos Shimadzu. O monitoramento de íons seletivos foi empregado e os íons selecionados foram 62, 74 e 89 *m/z*. A coluna utilizada para a separação do carbamato de etila foi DB Wax 60 m x 0,25 mm x 0,50 μm .

Para as análises, empregou-se o modo *split* (1:10), com a temperatura do injetor e do detector à 220 °C. O hélio foi utilizado como o gás de arraste em um fluxo de 1,5 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 2 μL . A temperatura da coluna foi programada como segue: temperatura inicial de 90 °C por 2 min, seguida de uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 150 °C e a partir desta temperatura, uma rampa de aquecimento de 40 °C/min até 220 °C.

Para a quantificação utilizou-se a técnica de padronização externa. A curva analítica foi preparada por meio da diluição de uma solução estoque de carbamato de etila na concentração de 10 mg/L, cuja variação linear foi de 0,05 a 0,75 mg/L. As amostras e as soluções da curva analítica foram analisadas em triplicata, sendo as primeiras previamente filtradas em membrana GV (*durapore*) em pvdf (0,22 μm x 12 mm).

Acroleína

A metodologia empregada para a quantificação de acroleína baseou-se na metodologia proposta por Nascimento e colaboradores,¹⁷ que consiste na derivação da amostra para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Os reagentes empregados para análise foram padrão de acroleína, metanol e acetonitrila (grau HPLC), água ultrapura, ácido sulfúrico, etanol absoluto e 2,4-dinitrofenil-hidrazina (2,4-DNPH), previamente purificado por três sucessivas recristalizações com metanol.

Para a preparação da 2,4-dinitrofenil-hidrazona de acroleína, H₂SO₄ concentrado (2 mL) foi adicionado a 0,4 g de 2,4-DNPH, seguido da adição de 3 mL de água destilada, gota à gota, até a solubilização completa. Imediatamente 10 mL de etanol 95% foram adicionados. Em outro recipiente, dissolveu-se 0,1 g de acroleína em 20 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se a solução preparada anteriormente, deixando a mistura em repouso aproximadamente por 15 min, até a formação de um precipitado. Filtrou-se e recristalizou-se duas vezes

com etanol absoluto. A pureza foi confirmada por determinação da temperatura de fusão e análise elementar (C, H e N) e por HPLC.

A derivação das amostras foi realizada pela adição de 4 mL da amostra e 50 μL de HClO₄ consecutivamente para 1 mL da solução 0,4% de 2,4-DNPH em acetonitrila. A solução resultante foi estocada à temperatura ambiente por aproximadamente 45 min, seguida pela filtragem em membranas de polietileno 0,45 μm (Milipore).

Um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20AD, detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, injetor automático modelo SIL-M20A e forno modelo CTO-20AC foram empregados para análises. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna empacotada Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm), com partículas esféricas de 5 μm , conectada a uma pré-coluna Shim-pack VP-ODS (5,0 cm x 4,0 mm, 5 μm - Shimadzu). A fase móvel utilizada foi ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 0 a 3 min (70% B); 3 a 5 min (70-85% B); 5 a 7 min (85-90% B); 7 a 9 min (90-70% B); 9 a 12 min (70% B). A absorbância foi medida a 365 nm, no fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 40 °C e volume de injeção de 20 μL .

A conversão quantitativa do aldeído nas bebidas destiladas em 2,4-dinitrofenil-hidrazona foi garantida pelo excesso de 2,4-DNPH empregada. A quantificação foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. A curva analítica foi obtida por sucessivas diluições da solução-estoque (1000 mg/L em acetonitrila) em solução de álcool 50%, com uma faixa linear de 0-20 mg/L. Essa foi obtida por regressão linear, plotando-se a área do pico versus concentração.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação dos métodos foram estimados utilizando-se os parâmetros da curva analítica, conforme equações abaixo:

$$LD = 3,3 \times s/S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times s/S \quad (2)$$

onde, *s* é 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 *S* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.^{21,22}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor alcoólico, metanol e furfural

Os resultados obtidos por meio das análises físico-químicas estão representados na Figura 1. Pode-se observar que, das amostras analisadas, 25% se apresentaram fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de cobre e 83,33% quanto à presença de furfural. O metanol não foi detectado nas amostras analisadas.

O teor alcoólico elevado observado na amostra 7 pode ser explicado pela utilização da bebida, na fabricação de blends, misturando-a com outras cachaças mais fracas. Quanto aos teores alcoólicos inferiores ao permitido na legislação, para as amostras 10 e 11, podem ser relacionados às condições de armazenamento da bebida, tais como umidade, temperatura e porosidade do barril ou ao corte incorreto durante a etapa de destilação. Pesquisas de Maia e Campelo mostraram que as perdas de etanol podem ser reduzidas durante o envelhecimento, mantendo-se a temperatura da adega abaixo de 20 °C e a umidade relativa do ar em torno de 85%.²³ Entretanto, mesmo

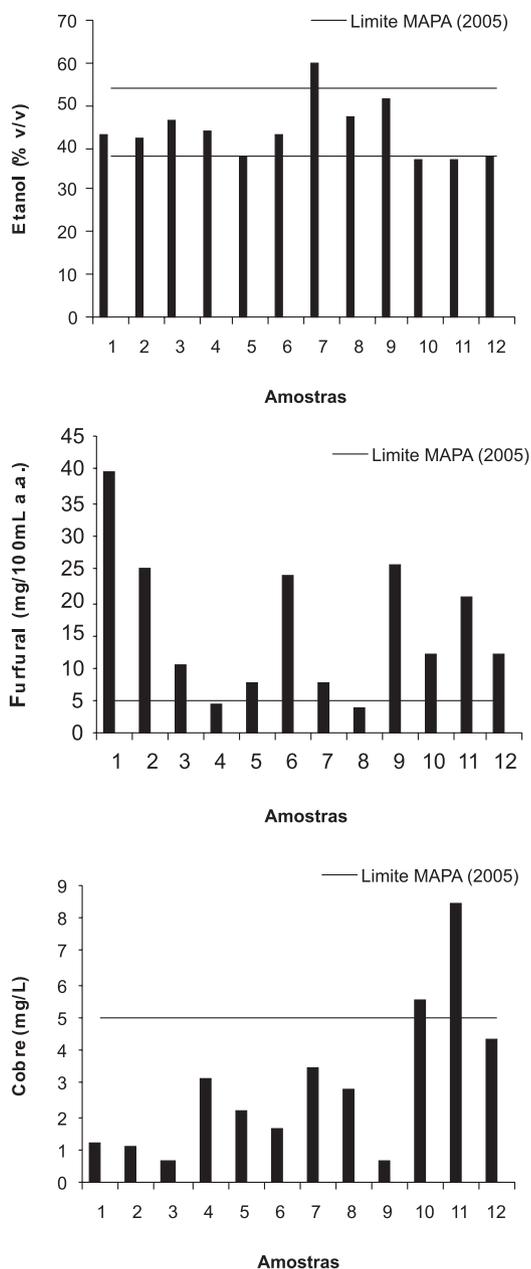


Figura 1. Teores de álcool etílico, furfural e cobre nas amostras de aguardente de cana

assim, pode ocorrer perda de 1% ao ano.

As concentrações obtidas nas amostras analisadas quanto ao teor de furfural variaram de 4,28 a 39,78 mg/100 mL de álcool anidro. Pelos resultados apresentados na Figura 1, pode-se observar que a maioria das amostras analisadas se apresenta fora dos padrões de qualidade exigidos, exibindo valores acima do permitido pela legislação brasileira (5 mg/100 mL de álcool anidro), exceto as amostras 4 e 8. Este composto é um aldeído indesejável na bebida, por ser considerado nocivo à saúde. A contaminação da bebida pode ocorrer por meio da degradação de pentoses durante as etapas de fermentação, destilação e envelhecimento da bebida. Outras possíveis formas de contaminação da bebida são por meio da requieira dos barris de madeira, no processo de envelhecimento e pela queima da cana durante a colheita.⁹⁻¹³

Estudos realizados por Miranda e colaboradores,²⁴ em cachaças armazenadas em tonéis de madeira, submetidos ao tratamento de irradiação por período de 390 dias, não mostraram influência do

processo de envelhecimento na formação de furfural. Para esses autores, a presença do contaminante está relacionada ao processo de destilação. Resultados semelhantes foram observados em sidras por Madera e colaboradores,¹¹ que constataram aumento de furfural apenas nas amostras que passaram por dupla destilação.

Barcelos e colaboradores,²⁰ analisando cachaças produzidas a partir de cana não queimada, proveniente de três regiões do Estado de Minas Gerais (Zona da Mata, sul de Minas e Vale do Jequitinhonha), verificaram concentrações de furfural dentro do limite estabelecido pelo MAPA. Os autores atribuíram a formação do furfural a falhas durante o processo fermentativo. Masson e colaboradores¹³ quantificaram furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada e verificaram que a queima do palhicho da cana-de-açúcar proporcionou um aumento significativo na concentração de furfural nas amostras analisadas. Segundo os autores, durante a queima, a exsudação do açúcar torna-se um excelente aderente ao colmo, de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e posteriormente para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural, chegando ao produto final.

Um problema comum que preocupa os produtores de aguardente de cana do Estado de Minas Gerais é o excesso de cobre nas bebidas. De acordo com a Figura 1, 16,67% das amostras analisadas apresentaram níveis superiores a 5 mg/L. A presença desse metal se deve principalmente à dissolução do carbonato básico de cobre [$\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$] presente nas paredes internas do alambique, pelos vapores ácidos da bebida. A contaminação pode ser evitada fazendo-se uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação⁸ ou filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica. Entretanto, recomenda-se um cuidado especial na utilização desses últimos, pois, alguns materiais retiram além do cobre substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida, descaracterizando-a.²⁵⁻²⁸ Quanto à relação entre o envelhecimento da bebida e o teor de cobre, alguns autores apontam o processo de envelhecimento como uma alternativa para a redução do metal na bebida. Cavalheiro e colaboradores²⁹ mostraram redução significativa quanto aos teores de cobre em 7 amostras de cachaça, de diferentes procedências, antes e após o armazenamento em tonéis de carvalho com capacidade de 5 L, por um período de 6 meses. Resultados similares foram obtidos por Miranda *et al.*,²⁴ que atribuíram a redução do cobre a um possível processo de absorção ou de adsorção promovido pela madeira, durante o processo de envelhecimento da bebida.

Carbamato de etila (CE)

A quantificação do carbamato de etila foi feita utilizando-se a técnica de padronização externa e as curvas analíticas foram obtidas por regressão linear ($y = 975050x + 2072,75$). O coeficiente de correlação obtido para a curva foi de 0,9997 e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de 15,7 e 52,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras apresentaram concentrações abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira (150 $\mu\text{g/L}$), sendo a maior concentração encontrada de 119 $\mu\text{g/L}$. Esses resultados se equiparam ao de Barcelos, que também não encontrou níveis de carbamato de etila nas cachaças do Sul de Minas Gerais.²⁰

Diversos autores relatam a presença elevada desse contaminante em aguardentes de cana. Andrade Sobrinho *et al.*,³⁰ investigando a presença de CE em amostras de cachaças, tiquira, grapa e uísque, relataram que elas apresentaram teores médios de 770, 2400, 45 e 140 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, observando que as amostras de cachaça

e tiquira apresentaram maiores concentrações para esse composto quando comparadas àquelas obtidas para as demais bebidas, além de estarem com a concentração de CE acima do limite exigido pela legislação.

Barcelos e colaboradores,²⁰ avaliando amostras de aguardente de cana de três diferentes regiões do Estado de Minas Gerais (Sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha), obtiveram valores que variaram de não detectado a 700 µg/L, encontrando um teor médio de 243 µg/L. Dentre as regiões estudadas, apenas as amostras do Vale do Jequitinhonha apresentaram níveis superiores ao estabelecido pelo MAPA para o contaminante em estudo.

Estudos de Labanca *et al.*,³¹ com 71 amostras de aguardente de cana provenientes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, demonstraram teores médios de 893 µg/L. Segundo os autores, 35% das amostras apresentaram teores de carbamato de etila entre 500 e 1000 µg/L e 12% continham teores 10 vezes maiores que o estabelecido pela legislação.

Para alguns autores, a realização da destilação da cachaça em alambiques de cobre poderia ser uma agravante na formação do carbamato de etila, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante.¹⁹ Porém, não se observou correlação entre o material do alambique e teores elevados de carbamato de etila nas amostras analisadas (Figura 2). Estes resultados corroboram com estudos realizados recentemente, como os de Barcelos *et al.* e Masson.^{20,32}

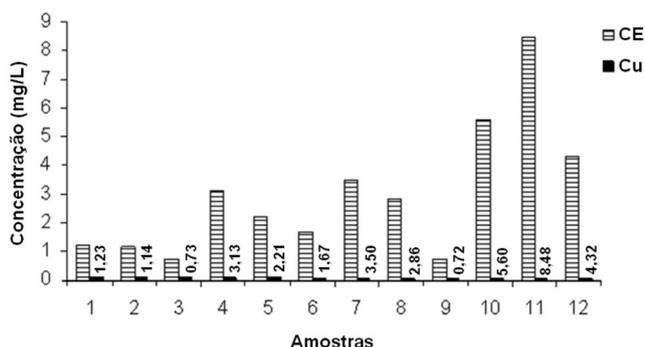


Figura 2. Comparação entre os teores de cobre e carbamato de etila nas amostras analisadas do Sul de Minas Gerais (CE – carbamato de etila e Cu – cobre)

Acredita-se que a formação do CE durante o período de armazenamento da cachaça ocorra de maneira gradativa, por meio da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados, intrínsecos do processo de produção da bebida, sendo os principais deles os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina. Além desses, outros compostos nitrogenados têm sido estudados como possíveis precursores para a formação do carbamato de etila antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto.^{33,34}

Diversos trabalhos relatam a influência positiva do tempo de estocagem e da temperatura na formação de carbamato de etila em vinhos e cachaças.³⁵⁻³⁸ Nesse processo, a provável via de formação do carbamato de etila seria por meio da reação do etanol com ureia e com citrulina.

Acroleína

A curva analítica foi obtida por regressão linear ($y = 133686,58x - 2471,76$) e o coeficiente de correlação de 0,9999, sendo y a área do pico obtida por meio das análises de acroleína e x a concentração

correspondente. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,02758 e 0,09194 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente.

As concentrações de acroleína presentes nas amostras de aguardente de cana analisadas estão mostradas na Figura 3.

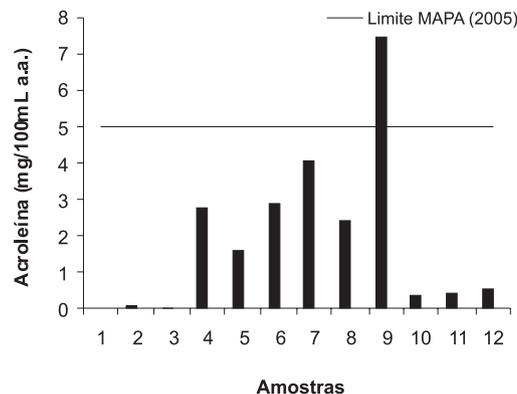


Figura 3. Concentrações de acroleína nas amostras de aguardente de cana analisadas do Sul de Minas Gerais

Pela análise dos resultados, pode-se observar valores para teores de acroleína de não detectado a 7,45 mg/100 mL de álcool anidro. Dentre as amostras analisadas, somente a amostra 9 se apresentou fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira, estando sua concentração acima do limite estabelecido de 5 mg/100 mL de álcool anidro.

Na literatura são encontrados poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em aguardentes de cana. Nascimento e colaboradores, analisando 56 amostras de aguardentes de cana oriundas de vários estados do Brasil, obtiveram concentrações que variaram de não detectada a 0,660 mg/100 mL de álcool anidro.¹⁷ Posteriormente, Nascimento *et al.*, avaliando a influência da destilação de aguardentes de cana em alambiques confeccionados com cobre e aço inox, quanto à presença de alcoóis, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas, não detectaram a presença de acroleína nas 3 amostras analisadas, provenientes de cada alambique.³⁹ Em 2006, Braga avaliou a presença de acroleína em aguardentes de cana produzidas com três linhagens de leveduras com temperatura de fermentação controlada (20 e 32 °C) e encontrou níveis inferiores a 0,7 mg/100 mL de álcool anidro para o contaminante.⁴⁰ Esses valores relatados na literatura mostram-se bem inferiores aos resultados obtidos para a maioria das amostras analisadas no presente trabalho.

Para Azevedo e colaboradores, esse contaminante pode ser formado durante o processo de fermentação da bebida, por meio da degradação do glicerol, podendo também estar associado à presença de bactérias termofermentativas (*Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*).⁴¹

CONCLUSÃO

Em termos físico-químicos, 25% das amostras analisadas apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de cobre e 83,33% quanto à presença de furfural. Todas as amostras apresentaram concentração abaixo do estabelecido pela Legislação (150,00 µg/L) para o carbamato de etila e, para a acroleína, apenas uma amostra apresentou níveis superiores a 5,00 mg/100 mL de álcool anidro. O metanol não foi detectado nas amostras analisadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológica (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de

Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida e apoio financeiro, aos produtores pelo fornecimento de amostras, ao Departamento de Química da UFLA e ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa pelo suporte nas análises.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Decreto nº 4851 de 02/11/ 2003, *Diário Oficial da União*, Brasília, 03/10/2003.
2. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução normativa nº 13 de 29/6/ 2005, *Diário Oficial da União*, Brasília, 30/6/2005, Seção 1.
3. Almeida, M. E. W.; Barreto, H. H. C.; *Revista do Instituto Adolf Lutz* **1971**, *31*, 117.
4. Pereira, N. E.; Cardoso, M. G.; Azevedo, S. M.; Morais, A. R.; Fernandes, W.; Aguiar, P. M.; *Ciência e Agrotecnologia* **2003**, *27*, 1068.
5. Siebalde, H. G. L.; Canuto, M. H.; Lima, G. M. de; Silva, J. B. B.; *Informe agropecuário* **2002**, *23*, 59.
6. Brasil, Leis, decretos, etc.; Decreto nº 2.314 de 04/9/1997, *Diário Oficial da União*, Brasília, 05/9/1997.
7. Azevedo, S. M.; *Ciência e Agrotecnologia* **2003**, *27*, 618.
8. Cardoso, M. G.; *Produção de aguardente de cana*, 2ª ed., UFLA: Lavras, 2006.
9. Moreno, M. V. G.; Barroso, C. G.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7556.
10. Ledauphin, J.; Guichard, H.; Saint-Clair, J. F.; Picoche, B.; Barillier, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 433.
11. Madrera, R. R.; Gomis, D. B.; Alonso, J. J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7969.
12. Risner, C. H.; Kiser, M. J.; Dube, M. F.; *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 179.
13. Masson, J.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Pimentel, F. A.; Morais, A. R.; Anjos, J. P.; *Ciência e Agrotecnologia* **2007**, *31*, 1805.
14. Sauvageot, N.; Gouffi, K.; Laplace, J. M.; Auffray, Y.; *International Journal of Food Microbiology* **2000**, *55*, 167.
15. Nougier, T.; Marty, J. L.; *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 453.
16. Fleet, G. H.; *Food Science and Technology: LWT* **2003**, *86*, 11.
17. Nascimento, R. F.; Marques, J. C.; Lima Neto, B. S.; Keukeleire, D.; Franco, D. W.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *782*, 13.
18. Mackenzie, W. M.; Clyne, A. H.; Macdonald, L. S.; *Journal of the Institute of Brewing* **1990**, *96*, 223.
19. Aresta, M.; Boscolo, M.; Franco, D. W.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2819.
20. Barcelos, L. V. F.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Anjos, J. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1009.
21. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2ª ed., Wiley: New York, 1997.
22. Harris, D. C.; *Análise química quantitativa*, 7ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2008.
23. Maia, A. B. R. A.; Campelo, E. A. P.; *Sebrae/MG/Sindbebedas*, Belo Horizonte, 2006.
24. Miranda, M. B.; Hori, J.; Alcarde, A. R.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 772.
25. Neves, E. A.; Oliveira, A.; Fernandes, A. P.; Nóbrega, J. A.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 33.
26. Cantão, F. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2006.
27. Lima, A. J. B.; Cardoso, M. G.; Guerreiro, M. C.; Pimentel, F. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 247.
28. Cantanhede, L. B.; Lima, J. B.; Lopes, G. S.; Farias, R. F.; Bezerra, C. W. B.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2005**, *25*, 500.
29. Cavalheiro, S. F. L.; Andrade-Sobrinho, L. G.; Cardello, H. M. A. B.; *B. CEPPA* **2003**, *21*, 99.
30. Andrade-Sobrinho, L. G.; Boscolo, M.; Lima-Neto, B. S.; Franco, D. W.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1074.
31. Labanca, R. A.; Glória, M. B. A.; Afonso, R. J. C. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1860.
32. Masson, J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2009.
33. Cook, R.; Mccaig, N.; Mcmillan, J. M. B.; Lumsden, W. B.; *Journal of the Institute of Brewing* **1990**, *96*, 233.
34. Lawrence, J. F.; Page, B. D.; Conacher, H. B. S.; *Advice Environment Science Technology* **1990**, *23*, 457.
35. Stevens, D. F.; Ough, C. S.; *American Journal Enology and Viticulture* **1993**, *44*, 309.
36. Hasnip, S.; Caputi, A.; Crews, C.; Breton, P.; *Food Addit. Contam., Part A* **2004**, *21*, 1155.
37. Andrade Sobrinho, L. G.; Cappelini, L. T. D.; Silva, A. A.; Galinaro, C. A.; Bushviser, S. F.; Cardoso, D. R.; Franco, D. W.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 116.
38. Nóbrega, I. C. C.; Pereira, J. A. P.; Paiva, J. E.; Lachenmeier, D. W.; *Food Chem.* **2009**, *117*, 693.
39. Nascimento, R. F.; Cardoso, D. R.; Lima-Neto, B. S.; Franco D. W.; Faria, J. B.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 735.
40. Braga, V. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
41. Azevêdo, L. C.; Reis, M. M.; Silva, L. A.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1968.

Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio

Santana, A.K.M.^{1,2}; Nunes, L.C.C.^{1,3}; Medeiros, F.P.M.^{1,2}; Silva, M.J.²; Lavra, Z.M.M.^{1,2}; Rolim-Neto, P.J.^{1*}

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, LTM, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LAFEPE, Recife, PE, Brasil.

³Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, NTF, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

Recebido 14/05/07 / Aceito 05/11/07

RESUMO

A osteoporose é definida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença metabólica óssea sistêmica, caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e da suscetibilidade a fraturas. A suplementação de cálcio pode ser realizada utilizando-se diferentes sais de cálcio. O mais recomendado é o carbonato de cálcio, que apresenta a maior quantidade de cálcio elementar (40%). Atualmente, quando todos os caminhos levam à busca da qualidade total, torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação é uma ferramenta da qualidade adequada para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade de um método analítico, pois é um ato documentado que atesta que o mesmo conduz a resultados esperados. A escolha de uma metodologia é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade da substância ativa ou da forma farmacêutica. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo desenvolver e validar o método de doseamento da matéria-prima carbonato de cálcio por titulometria. As características de desempenho investigadas no processo de validação foram: exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez. Os resultados obtidos demonstraram que o método é robusto, exato e preciso, apresentando resultados reprodutíveis e confiáveis.

Palavras-chave: validação; titulometria; carbonato de cálcio.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um método analítico, adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação (Brito et al., 2003).

A validação do método analítico é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e se constitui em uma das exigências das normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes (Soares Sobrinho et al., 2006).

Em um programa de garantia de qualidade bem estruturado, a validação do método constitui-se em atividade essencial e inicial, representando um fator crítico na validação do processo produtivo (Soares Sobrinho et al., 2005).

Segundo a RDC 210 (ANVISA, 2003b), validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação, ou sistema realmente conduz aos resultados esperados.

A validação tem como objetivo principal assegurar que determinado procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (Matioli et al., 2004). Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, sensibilidade, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003a).

Uma vez validada uma metodologia analítica, esta pode ser utilizada como pré-requisito para o estudo de estabilidade bem como para o próprio controle de qualidade, além de ser utilizada na validação de limpeza e processo (Silva Filho et al., 2006).

A necessidade da validação é justificada por ser um requisito inerente aos modernos processos de registro de medicamentos, para garantir a qualidade do produto, bem como para a indústria, do ponto de vista econômico e de competitividade no mercado (Monteiro et al., 2006).

A validação a ser realizada nesse estudo é para quantificação do carbonato de cálcio, este apresenta-se como suplemento mineral, fonte de cálcio, e sua determinação foi realizada através de método volumétrico de complexação.

Os suplementos de cálcio são geralmente encontrados na forma de sais ou combinações de sais, por exemplo, carbonato, citrato, lactato e fosfato. Tais suplementos irão variar no conteúdo de cálcio, com maior porcentagem para carbonato de cálcio (40%). A ingestão de

*Autor Correspondente: Pedro José Rolim Neto - Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - Departamento de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE - R. Prof. Arthur de Sá s/nº - Cidade Universitária - CEP: 50740-521 - Recife - PE, Brasil - Fone / Fax: (81) 3272-1383 - e-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

doses de 1500mg/dia de cálcio ajuda na prevenção e tratamento da osteoporose (Bedani & Rossi, 2005).

A titulação por formação de complexos são reações que dependem da combinação de íons, diversos dos íons de hidrogênio e hidróxido, que formam um íon ou um composto levemente dissociado. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), comumente na forma de sal dissódico, é um reagente muito importante para as titulações com formações de complexos e se tornou um dos mais notáveis reagentes usados na titrimetria (Jeffery et al., 1992).

Com isso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar o método analítico de doseamento do carbonato de cálcio matéria-prima através da titulometria por complexação, com intuito de otimizar o método farmacopeico, garantindo que este atenda às exigências das aplicações analíticas, preconizadas pela ANVISA.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Para o estudo desenvolvido, foram utilizadas vidrarias certificadas e reagentes preparados conforme métodos farmacopeicos, de forma a minimizar possíveis variáveis que poderiam influir na confiabilidade do método empregado.

Instrumentos

Balança analítica (Shimadzu® AW 220), estufa (Imarvil®), espátula, agitador magnético (Quimis®), inã de agitação e suporte metálico.

Reagentes

EDTA 0,05M (SV) Merck® ácido clorídrico PA (Quimex®), hidróxido de sódio (Nuclear®), azul de hidroxinaftol (Vetec®) e água deionizada.

Amostra utilizada

Carbonato de cálcio (Dinalab®, teor: 97,44%).

MÉTODOS

Desenvolvimento do método analítico

O método analítico utilizado foi uma adaptação do doseamento do carbonato de cálcio matéria-prima descrito na USP (*United States Pharmacopoeia*, 2006). Segundo este, para o preparo da amostra deve-se pesar 200mg de carbonato de cálcio e dessecar a 200°C por quatro horas. Umedecer a amostra com um pouco de água purificada e adicionar lentamente ácido clorídrico 3 N suficiente para dissolver. Adicionar 100mL de água, 15mL de hidróxido de sódio 1 N e 300mg de azul de hidroxinaftol, titular com uma solução

de EDTA 0,05 M (SV) até coloração azul. Cada mL de EDTA equivale a 5,004mg de carbonato de cálcio.

A adaptação proposta foi avaliar a necessidade de dessecação da amostra e a quantidade de indicador suficiente para a verificação do ponto de equivalência.

A partir do método farmacopeico foi realizada uma análise comparativa do doseamento, com e sem dessecar a amostra, com o intuito de aumentar a agilidade do processo analítico. Em seguida, foram testadas variações na quantidade de indicador utilizada, visto que o mesmo dificultava a visualização do ponto de viragem.

Validação do método analítico

Parâmetros avaliados

Conforme a Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003, considerando que este trabalho encontra-se classificado na Categoria I da Tabela 2, foram avaliados os parâmetros de: robustez, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão para validação do método de doseamento de carbonato de cálcio matéria-prima (ANVISA, 2003a).

Robustez

A robustez é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros e fornecer indicações de segurança durante o uso normal.

Para validação do método foram analisadas variações nos volumes de hidróxido de sódio e fabricante do EDTA. Foram realizadas análises das amostras em seis replicatas na concentração de 200mg (100%).

Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

O teste foi realizado a partir de três curvas autênticas, construídas por cinco concentrações (100, 125, 150, 175 e 250mg) que variaram num intervalo de 50% a 125% da concentração do teste, ou seja, dentro da faixa de aceitação do produto.

Precisão

O teste de precisão pode avaliar os critérios de repetitividade, precisão intermediária e de reprodutibilidade. Neste trabalho, a precisão foi avaliada em dois níveis, repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade (precisão intra-ensaio) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária (precisão inter-ensaio) corresponde à concordância entre os resultados

Quantificação do carbonato de cálcio

do mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A repetitividade foi determinada pela análise de seis replicatas e a precisão intermediária também realizada em seis replicatas, mas em dois dias por analistas diferentes.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor teórico.

A exatidão foi obtida a partir de análises de amostras em concentrações conhecidas de carbonato de cálcio, em três replicatas, equivalentes a 50, 100 e 150% (baixa, média e alta) da concentração teórica analisada (200mg), cobrindo a faixa especificada do produto que varia de 98,5 a 100,5%.

Análise Estatística

Utilizou-se ANOVA como ferramenta estatística para análise dos dados obtidos bem como teste *t* de student, teste T, coeficiente de variação-CV, desvio padrão-desvpd e média (Granjeiro Júnior et al., 2004).

RESULTADOS

Desenvolvimento do método

Retirada da dessecação

Com o intuito de agilizar a análise do teste de doseamento, bem como de reduzir o custo, verificou-se a interferência da etapa de dessecação durante a análise.

Tendo em vista que a dessecação é utilizada apenas para a retirada da umidade residual, acreditando não interferir no procedimento. O estudo comparativo foi realizado em quadruplicata. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos desta análise e o tratamento estatístico realizado pelo teste *t*-Student que analisou se havia diferença entre as médias obtidas.

Quantidade de indicador

A quantidade de indicador preconizada pela monografia inscrita na Farmacopéia Brasileira (1988), de 300mg, dificultava a visualização do ponto de viragem, por isso foi realizado um estudo prévio para se determinar a quantidade de indicador ideal para se visualizar o ponto de equivalência com nitidez. Foram testadas seis replicatas utilizando quantidade de azul de hidroxinaftol equivalente a 150, 225 e 300mg. A Tabela 2 mostra o resultado obtido das análises pelo método em desenvolvimento. Foi realizado o tratamento estatístico através da ANOVA (Granjeiro Júnior et al., 2004) que analisou se havia diferença entre as médias obtidas a partir das quantidades de indicador em estudo.

Validação do método de doseamento de carbonato de cálcio - matéria-prima

Parâmetros avaliados

Linearidade

Os resultados da linearidade estão expostos na Tabela 3. Os pontos das três curvas de linearidade foram plotados em um único gráfico evidenciado na Figura 1.

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos das análises realizadas com e sem a dessecação e o tratamento estatístico presumindo variâncias diferentes.

Método	Amostras – Concentração (%)				Média (%)	DPR (%)	<i>t</i> (cal)	<i>t</i> (0.95 , 3)
	1	2	3	4				
Com dessecação	97,57	96,29	97,06	96,80	96,93	0,55	1,2641	2,4469
Sem dessecação	97,57	97,57	97,06	97,06	97,32	0,30		

Tabela 2 - Avaliação da quantidade de indicador a ser empregado no método em desenvolvimento utilizando ANOVA *one-way*.

Quantidade de indicador (mg)	Amostras – Concentração (%)						Média (%)	DPR (%)	F(cal)	F(0.95,5)
	1	2	3	4	5	6				
150	96,95	96,83	96,95	96,83	97,09	97,09	96,96	0,12	2,5046	3,6823
225	97,09	96,95	97,09	97,09	96,83	96,83	96,98	0,13		
300	96,83	97,09	97,20	97,33	97,09	97,20	97,12	0,17		

Quantificação do carbonato de cálcio

Tabela 3 - Resultados da linearidade.

Concentração de CaCO ₃ (mg)	Concentração de CaCO ₃ (mg)			Média das curvas (mg)	DPR (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
100	98,33	97,58	97,33	97,75	0,53
125	121,10	121,35	121,10	121,18	0,12
150	145,37	145,62	146,12	145,70	0,26
175	171,14	170,14	172,64	171,31	0,73
250	245,20	247,70	246,20	246,37	0,51

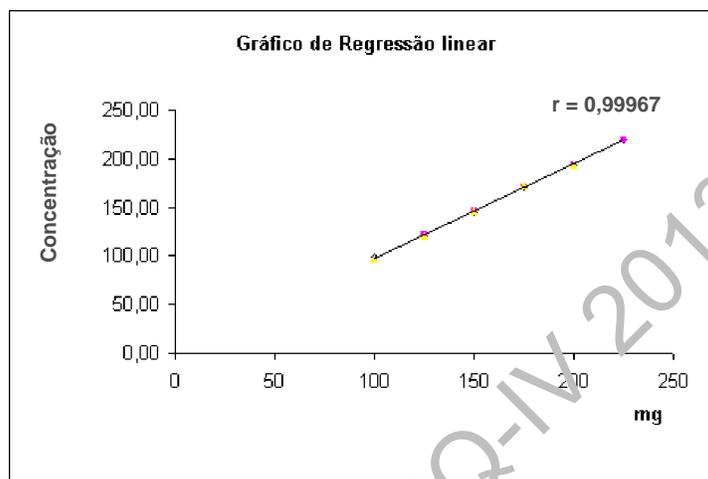


Figura 1. Curva analítica

Tabela 4 - Resultado da robustez variando a quantidade de hidróxido de sódio 1 N.

Volume de NaOH (mL)	Amostras – Concentração (%)						Média (%)	DPR (%)	F(cal)	F(0,95,5)
	1	2	3	4	5	6				
13	96,33	96,70	96,58	96,83	96,70	97,08	96,70	0,26		
15	97,20	96,70	96,35	96,33	97,08	97,08	96,89	0,33	0,5988	3,6823
17	96,70	96,33	97,08	96,95	96,45	97,08	96,77	0,33		

Tabela 5 - Resultado da robustez variando diferentes fabricantes de EDTA 0,05 M, presumindo variâncias equivalentes.

Procedência do EDTA	Amostras – Concentração (%)						Média (%)	DPR (%)	t (cal)	t (0,95,5)
	1	2	3	4	5	6				
	96,83	96,45	96,58	96,58	96,33	96,58	96,56	0,17		
Nuclear®	96,53	96,40	96,40	96,65	96,65	96,78	96,57	0,16	1,1417	2,2622

Robustez

Os resultados obtidos com o parâmetro robustez para o volume de NaOH 1N utilizado foram tratados estatisticamente através da ANOVA *one-way*, para avaliar se havia diferença entre as médias obtidas e estão demonstrados na Tabela 4.

A avaliação da procedência (fabricante) de EDTA foi realizada utilizando uma solução da Merck® e outra solução preparada com o sal da Nuclear®, o qual foi fatorado

segundo método farmacopeico. Os resultados estão dispostos na Tabela 5.

Precisão

Repetitividade

A repetitividade foi realizada em sextuplicata e os resultados obtidos encontram-se expostos na Tabela 6.

Quantificação do carbonato de cálcio

Precisão Intermediária

Os resultados obtidos com este parâmetro estão dispostos na Tabela 7.

O tratamento estatístico realizado pelo teste *t*-Student verificou se havia diferença entre as médias obtidas entre os analistas no primeiro e segundo dia, assim como

entre o mesmo analista nos diferentes dias, podendo ser visualizado na Tabela 8.

Exatidão

Os resultados obtidos com o parâmetro exatidão estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 6 - Resultado analítico da repetitividade do método.

Amostras	Concentração (%)						Média (%)	DPR (%)
	1	2	3	4	5	6		
	96,58	96,33	96,58	95,08	97,33	96,08	96,33	0,77

Tabela 7 - Resultado analítico da precisão intermediária do método.

		Amostras – Concentração (%)					Média (%)	DPR (%)
		1	2	3	4	5		
Analista 1	1º dia	98,58	97,83	97,58	96,95	97,35	97,05	1,68
	2º dia	97,83	97,32	97,32	97,53	97,32	97,47	0,23
Analista 2	1º dia	97,58	97,08	97,58	97,58	97,32	97,43	0,23
	2º dia	97,32	97,63	97,58	97,58	97,08	97,44	0,24

Tabela 8 - Tratamento estatístico da precisão intermediária do método.

	<i>t</i> calculado	<i>t</i> (0,95, 5)
1º dia – Analistas 1 e 2	0,5080	2,7765
2º dia – Analistas 1 e 2	0,2460	2,3060
Analista 1 – 1º e 2º dias	0,5703	2,7765
Analista 2 – 1º e 2º dias	0,0689	2,3060

Tabela 9 - Resultado analítico e tratamento estatístico da exatidão.

Concentração teórica (%)	Amostras (mg)			Média (%)	DPR (%)	<i>t</i> (cal)	<i>t</i> (0,95, 2)
	1	2	3				
50	99,08	99,58	99,08	99,16	0,38	3,8099	
100	199,16	198,91	199,66	199,24	0,38	3,4470	4,303
150	298,99	299,24	299,74	299,32	0,38	3,0842	

DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método

Retirada da dessecação

Conforme observado na Tabela 1, como o *t* calculado é menor que o *t* tabelado, pode-se afirmar que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados médios obtidos, com um intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, a retirada da dessecação passou a ser utilizada pelo método, por ser mais viável na rotina laboratorial.

Quantidade de indicador

De acordo com a Tabela 2, o *F* calculado é menor que o *F* tabelado, logo se confirmou estatisticamente que o método não sofreu interferência com as diferentes quantidades de indicador testadas, e desta forma adotou-se 150mg, em virtude da melhor visualização do ponto de viragem e também considerando uma provável redução de custo operacional.

Validação do método

Parâmetros avaliados

Linearidade

Pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a seguinte equação da reta: $y = 0,9947x - 2,6855$. A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de determinação (R^2) muito próximo da unidade (0,99967), o que comprova a linearidade do método.

Através da análise de variância (ANOVA), podemos testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. Utilizando a razão entre a média quadrática devido à falta de ajuste e a média quadrática devido ao erro puro foi possível verificar se houve falta de ajuste.

Esta relação apresentou um F calculado de 2,7192 abaixo do valor crítico tabelado 3,7083; onde podemos afirmar no nível de 95% de confiança que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

A partir da curva analítica foram estimados o LD e LQ, através das fórmulas $LQ = DP_a \times 10/IC$ e $LD = DP_a \times 3/IC$, obtendo os seguintes valores $LD = 1,41$ mg e $LQ = 2,14$ mg. Onde: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, médio das três curvas e IC é a inclinação da curva de calibração.

Robustez

De acordo com os resultados descritos nas Tabelas 4 e 5, e o tratamento estatístico realizado por ANOVA *one-way* e pelo teste *t*-Student respectivamente, pode-se afirmar que o método é robusto, com 95% de confiança, pois não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos parâmetros avaliados.

Precisão

De acordo com os resultados expostos na Tabela 6 pode-se concluir que o método apresenta uma boa repetitividade, visto que o desvio padrão relativo é inferior a 5%, limite especificado pela RE 899 ANVISA (2003a).

Como observado nas Tabelas 7 e 8, o *t* calculado é menor que o *t* tabelado, logo podemos afirmar com 95% de confiança que não há diferença estatisticamente significativa entre dias e analistas. Portanto, o método apresenta-se preciso intra-corrida e inter-corrida.

Exatidão

De acordo com o tratamento estatístico realizado por *t*-Student, vendo que o *t* calculado foi inferior ao *t* tabelado para as concentrações citadas na Tabela 9, não há evidência de erro sistemático no método analítico com nível de confiança de 95%, comprovando assim que o método é exato.

A partir dos resultados obtidos, o método passou a ser utilizado sem a necessidade de dessecar a amostra, tornando-o mais rápido e prático. Outra modificação importante foi a redução da quantidade de indicador com o intuito de facilitar a percepção do ponto de equivalência.

Os parâmetros investigados garantiram que o método é robusto, exato e preciso para determinação de teor de carbonato de cálcio, portanto é considerado validado, conforme a RE 899, ANVISA. É um método simples, rápido e apresenta confiabilidade e segurança necessária para procedimentos analíticos, sendo recomendado para análises em laboratórios de controle de qualidade. Apresenta-se portanto, como uma alternativa de baixo custo para a rotina da indústria farmacêutica e farmácias magistrais.

ABSTRACT

Optimization and validation of volumetric analytical method for calcium carbonate assay

Osteoporosis is defined by the World Health Organization as a systemic metabolic bone disease characterized by a reduction in bone mass and deterioration of the bone tissue microarchitecture, resulting in an increase in bone fragility and susceptibility to fractures. Calcium supplementation can be carried out with various calcium salts. The most recommended is calcium carbonate, which has the greatest proportion of elementary calcium (40%). Nowadays, when all paths in product development are converging on a search for total quality, it is becoming indispensable to know as much as possible about each phase of a production process. In the case of an analytical method, validation is a suitable quality control tool to ensure its reliability and reproducibility, as it is a documented procedure that certifies that it leads to the expected results. The choice of analytical method is of fundamental importance to controlling the quality of an active substance or a dosage form. Therefore, the aim of this study was to develop and validate the use of titration as the dosing method for the raw material calcium carbonate. The performance characteristics investigated in the validation were: accuracy, precision, detection limit, quantitation limit, linearity and robustness. The results obtained show that the method is robust, accurate and precise, giving reproducible and reliable results.

Keywords: validation; titration; calcium carbonate.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.

Quantificação do carbonato de cálcio

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 210, de 04 de Agosto de 2003. *Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 de agosto de 2003b.

Bedani R, Rossi EA. O consumo de cálcio e a osteoporose. *Semina Ciênc Biol Saúde* 2005; 26(1):3-14.

Brito NM, Amarante Júnior OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas* 2003; 13(dez/jan):129-46.

Farmacopéia brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu; 1988, pt.1. p.V.1.5-V.1.5-4.

Grangeiro Júnior S, Galindo Bedor DC, Soares Sobrinho JL, Strattmann R, Rolim Neto PJ, Albuquerque MM. Validação da metodologia analítica de comprimido à base de nevirapina. *Controle de Contaminação* 2004; 7(65):25-8.

Jeffery GH, Basset J, Mendham J, Denney RC. *Vogel*: análise química quantitativa. 5ª.ed. Rio de Janeiro: LTC; 1992.

Matioli G, Valentini SR, Sommer WA. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia da qualidade. *Acta Scientiarum Health Sci* 2004; 16(2):357-64.

Monteiro DB, Braga JMF, Albuquerque MM, Strattmann R, Silva KER, Rolim Neto PJ. Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento da matéria-prima lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Farm* 2006; 87(4):120-3.

Silva Filho CA, Araújo JCF, Silva PRP. Metodologia analítica por titulometria para paracetamol - Parte I. *Controle de Contaminação* 2006, 8(85):30-4.

Soares Sobrinho JL, Nunes LCC, Grangeiro Júnior S, Roca MF De La, Rolim Neto PJ. Alternativa para o doseamento de metildopa comprimido: desenvolvimento e validação do método analítico. *Controle de Contaminação* 2006; 7(82):31-5.

Soares Sobrinho JL, Nunes LCC, Grangeiro Júnior S, Roca MF De La, Rolim Neto PJ. Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: caso paracetamol. *Controle de Contaminação* 2005; 7(73):35-41.

The United States Pharmacopeia. 29th.ed. Rockville: The United States Pharmacopial Convention, 2006.

Minicursos CRQ-IV 2013