



UNIVERSIDADE DE UBERABA

PRÓ REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
MESTRADO PROFISSIONAL

SARAH GABRIELA SANTOS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-  
VIS NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PHMB EM DESINFETANTES  
HOSPITALARES**

UBERABA MG  
2022



**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS NA DETERMINAÇÃO DO  
TEOR DE PHMB EM DESINFETANTES HOSPITALARES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Mestrado Profissional da Universidade de Uberaba (PPGEQ-MP/UNIUBE).

**Orientador:** Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer

**Coorientador:** Prof. Dr. Leonardo Campos de Assis.

UBERABA-MG

2022

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S59v Santos, Sarah Gabriela.  
Validação de método analítica espectrofotométrico UV-VIS na  
determinação do teor de PHMB em desinfetantes hospitalares / Sarah  
Gabriela Santos. – Uberaba, 2022.  
61 f. : il., color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de  
Mestrado Profissional em Engenharia Química.  
Orientador: Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer.  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Campos de Assis.

1. Química analítica. 2. Engenharia química. 3. Controle de qualidade  
– Métodos estatísticos. I. Finzer, José Roberto Delalibera. II. Assis,  
Leonardo Campos de. III. Universidade de Uberaba. Programa de  
Mestrado Profissional em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 543

SARAH GABRIELA SANTOS

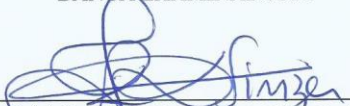
**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS NA  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PHMB EM DESINFETANTES HOSPITALARES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Engenharia Química  
do Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química - Mestrado Profissional da Universidade de  
Uberaba (PPGEQ-MP/UNIUBE).

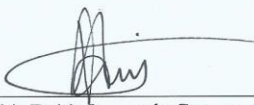
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos  
Químicos Agroindustriais

Aprovado em: 27/10/2022

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof(a). Dr(a). José Roberto Delalibera Finzer - Orientador  
Universidade de Uberaba

MURILO DANIEL DE MELLO Assinado de forma digital por MURILO  
DANIEL DE MELLO  
INNOCENTINI:10290211808  
Dados: 2023.05.02 12:53:53 -03'00'  
Prof(a). Dr(a). Murilo Daniel de Mello Innocentini  
Universidade de Ribeirão Preto

  
Prof(a). Dr(a). Leonardo Campos de Assis  
Universidade de Uberaba



## **DEDICATÓRIA**

Aos meus avós Nilton Camilo dos Santos (*in memorian*), Sebastião Domingos (*in memorian*), Irene Bastista dos Santos e Zenaide de Souza, a base da nossa família.

Aos meus pais e irmãos por sempre caminharem comigo.

Ao meu namorado Caio Gustavo de Oliveira pelo incentivo e admiração.

A todos os mestres que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao universo, pela incrível experiência de aprendizagem, saúde e disposição.

Agradeço aos meus pais, Nilton Santos Filho e Beatriz Alvarenga de Souza Santos pela educação e formação.

Agradeço aos meus irmãos, Natália Beatriz Santos, Rafael Leando Santos, Samuel Adriano Santos, Noemi Nayara Santos e Samar Caroline Santos pela incrível união, amor e amizade.

Agradeço ao meu namorado Caio Gustavo de Oliveira, pela paciência e parceria.

Agradeço a Ecomaster Química Indústria e Comércio, pelo suporte e credibilidade ao meu trabalho.

Agradeço as minhas grandes amigas Stelina Timani, Aline Crema, Talita dos Santos, Luana Leal e Thaís Canteiro pela torcida, carinho e contribuição ao trabalho.

Agradeço ao Sílvio Kumada, por confiar no meu trabalho e empenho, e por partilhar tantas experiências profissionais e de vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. José Roberto Delalibera Finzer e coorientador Dr. Leonardo Campos de Assis, por partilhar todo conhecimento e parceria ao longo dos anos acadêmicos.

Agradeço ao professor Dr. Mauro Luís Begnini, pelo apoio e parceria.

Agradeço ao Sr. Pedro dos Santos e equipe, pelos conselhos, amizade e pelo trabalho social dedicado ao esporte.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG

Agradeço à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Agradeço à UNIUBE - Universidade de Uberaba pelo suporte dado ao desenvolvimento dessa dissertação.



## EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre  
aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer



## RESUMO

Os métodos analíticos são ferramentas de confiabilidade da cadeia produtiva industrial, que impactam diretamente na qualidade do processo. O estudo de desenvolvimento e validação do método analítico para o ativo PHMB (polyhexametileno de biguanida) para dois desinfetantes hospitalares de nível intermediário apresentados no presente trabalho, foi desenvolvido através de parâmetros estatísticos. Avaliou-se a seletividade, linearidade, exatidão, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação do método analítico, através da leitura das soluções analíticas no espectrofotômetro na região UV-VIS na faixa de 237 nm. Desenvolveu-se o estudo do analito *versus* desinfetante diluído e desinfetante concentrando, avaliando o comportamento das matrizes de cada um dos produtos acabados. Os critérios de aceitação de cada parâmetro foram definidos de acordo com orientações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), RDC 166 de 24 de Julho de 2017. Para seletividade observou-se para ambas formulações a interferência na matriz na formulação, entretanto o método apresentou-se linear, exato e preciso, definiu-se o limite de quantificação e limite de detecção na concentração de 0,5 p.p.m. Perante os resultados obtidos, o método analítico foi validado para ser utilizado na liberação de lotes para o mercado, garantindo a qualidade da análise no processo de quantificação do teor do ativo PHMB nas formulações estudadas.

**Palavras-chave:** Qualidade. Parâmetros Analíticos. Controle de Qualidade. Melhoria Contínua. RDC N° 166.



## ABSTRACT

Analytical methods are reliability tools for the industrial production chain, which directly impact the quality of the process. The development and validation study of the analytical method for the active PHMB (polyhexamethylene of biguanide) for two intermediate level hospital disinfectants presented in the present work, was developed using statistical parameters. The selectivity, linearity, accuracy, intermediate precision, limit of detection and limit of quantification of the analytical method were evaluated, through the reading of the analytical solutions in the spectrophotometer in the UV-VIS region in the range of 237 nm. The study of the analyte versus diluted disinfectant and concentrated disinfectant was carried out, evaluating the behavior of the matrices of each of the finished products. The acceptance criteria for each parameter were defined according to ANVISA (National Health Surveillance Agency) guidelines, RDC 166 of July 24, 2017. For selectivity, interference in the matrix in the formulation was observed for both formulations, however the method presented linear, exact and precise, the quantification limit and detection limit were defined at the concentration of 0.5 p.p.m. In view of the results obtained, the analytical method was validated to be used in the release of batches to the market, guaranteeing the quality of the analysis in the process of quantifying the content of the PHMB active in the studied formulations.

**Keywords:** Quality. Analytical Parameters. Quality control. Continuous Improvement.

RDC N° 166.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de Validação de Metodologia Analítica .....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> – Estrutura do Polihexametileno de Biguanida .....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b> – Representação de uma cadeia de quaternário de amônio .....	<b>22</b>
<b>Figura 4</b> – Locais em ambientes hospitalares considerados como propagador de microrganismos.....	<b>25</b>
<b>Figura 5</b> - Biguanida com formação do grupo de amina e cianoguanidina .....	<b>29</b>
<b>Figura 6</b> - A presença do PHMB destabiliza os $Ca^{2+}$ presente na célula, os grupos de hexametileno do PHMB são hidrofóbicos interagindo com os fosfolípidos que mbém são hidrofóbicos, levando a dissolução da membrana .....	<b>30</b>
<b>Figura 7</b> – Tipos de radiação de acordo com comprimento da onda .....	<b>31</b>
<b>Figura 8</b> – Feixe incidente.....	<b>31</b>
<b>Figura 9</b> – (a) fonte de luz (b) colimador (c) prisma ou rede de difração (d) fenda seletora (e) cubeta contendo solução (f) detector (g) leitor.....	<b>32</b>
<b>Figura 10</b> – Espectrofotômetro UV/VIS Bell Enginnering.....	<b>41</b>
<b>Figura 11</b> – Etapas 1, 2 e 3 para Seletividade .....	<b>42</b>
<b>Figura 12</b> – Etapas 1, 2 e 3 para Linearidade e Faixa de Trabalho.....	<b>43</b>
<b>Figura 13</b> – Etapa 1, 2 e 3 para Repetibilidade.....	<b>44</b>
<b>Figura 14</b> – Etapa 1, 2 e 3 para Precisão Intermediária .....	<b>44</b>

<b>Figura 15</b> – Testes para Exatidão.....	<b>45</b>
<b>Figura 16</b> – Testes para limite de quantificação e limite de detecção .....	<b>46</b>
<b>Figura 17</b> – Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinfetante diluído <i>versus</i> analito	<b>49</b>
<b>Figura 18</b> – Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinfetante concentrado <i>versus</i> analito.....	<b>49</b>
<b>Figura 19</b> – Reta da regressão linear para os casos estudados: desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito.....	<b>51</b>
<b>Figura 20</b> – Plotagem dos resíduos do desinfetante diluído (1a), do desinfetante concentrado (1b) e analito (PHMB) (1c). .....	<b>52</b>
<b>Figura 21</b> – Plotagem do gráfico Solução Amostra 1, Solução Amostra 2 e solução Amostra 3 .....	<b>56</b>
<b>Figura 22</b> – Plotagem do gráfico Solução Amostra 4 e Solução Amostra 5.....	<b>58</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana RDC N° 700/2022..	26
Tabela 2 – Agentes Alquilantes usados na síntese dos quaternários .....	28
Tabela 3 – Parâmetros a serem considerados na validação de metodologia de acordo com a RDC n° 166 de 24 Julho de 2017 .....	33
Tabela 4 – Critério de aceitação para Repetibilidade .....	37
Tabela 5 – Critérios de aceitação para recuperação média .....	39
Tabela 6 – Resultados estatísticos para matriz desinf. diluído <i>versus</i> analito.....	48
Tabela 7 – Resultados estatísticos para matriz desinf. Conc. <i>versus</i> analito.....	48
Tabela 8 – Equações da reta dos resultados estatísticos referentes as (Tabela 6) e (Tabela 7)	48
Tabela 9 – Resultados estatísticos para desinf. diluído e desinf. conc. e analito .....	50
Tabela 10 – Resultados estatísticos para o estudo de linearidade do desinf. diluído , desinf. conc. e analito (PHMB) .....	50
Tabela 11 – Desvio padrão relativo obtido para desinfetante diluído, desinfetante concentrado e o analito .....	53
Tabela 12 – Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o desinf. diluído .	54
Tabela 13 – Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o desinf. conc. ...	54
Tabela 14 – Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o analito .....	54

Tabela 15 – Resultados para a Solução Amostra 1 e Solução Amostra 2.....	55
Tabela 16 – Resultados para Solução Amostra 3 .....	55
Tabela 17 – Equação da reta para Solução Amostra 1, Solução Amostra 2 e Solução Amostra 3 .....	55
Tabela 18 – Resultados para Solução Amostra 4 .....	57
Tabela 19 – Resultados para Solução Amostra 5 .....	57
Tabela 20 – Equação da reta da Solução Amostra 4 e Solução Amostra 5.....	57
Tabela 21 – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	59
Tabela 22 – Resultados obtidos para matriz desinf. diluído <i>versus</i> analito, para seletividade ..	66
Tabela 23 – Resultados obtidos para matriz desinfetante concentrado <i>versus</i> analito, para seletividade.....	66
Tabela 24 – Resultados das réplicas do desinfetante diluído para linearidade e faixa de trabalho .....	67
Tabela 25 – Resultados das réplicas do desinfetante concentrado para linearidade e faixa de trabalho.....	67
Tabela 26 – Resultados das réplicas do analito para linearidade: PHMB e faixa de trabalho. .	67
Tabela 27 - Resultados para repetibilidade das análises do desinfetante diluído.....	67
Tabela 28 – Resultados para repetibilidade das análises do desinfetante concentrado. ....	68
Tabela 29 – Resultados para repetibilidade das análises do analito .....	29

Tabela 30– Resultados para precisão intermediária das análises do desinfetante diluído .....	68
Tabela 31– Resultados para precisão intermediária das análises para o desinf. concentrado ..	69
Tabela 32 – Resultados para precisão intermediária das análises do analito. ....	69
Tabela 33 – Resultados para recuperação da Solução Amostra 1: desinfetante diluído.....	69
Tabela 34 – Resultados para recuperação da Solução Amostra 2: desinfetante concentrado....	70
Tabela 35 – Resultados para recuperação da Solução Amostra 3: analito.....	70
Tabela 36 – Resultados para Recuperação da Solução Amostra 4 = Solução Amostra 1 (desinfetante diluído) + Solução Amostra 3 (analito) .....	70
Tabela 37 – Resultados para Recuperação da Solução Amostra 5 = Solução Amostra (desinfetante concentrado) + Solução Amostra 3(analito) .....	70
Tabela 38 – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação das réplicas da matriz desinfetante diluído fortificados com analito. ....	71
Tabela 39 – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação das réplicas da matriz desinfetante concentrado fortificados com analito .....	71
Tabela 40 – Resultados para Limite de Detecção de Limite de Quantificação das réplicas do analito. ....	71



## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
CGRE:	Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO
DPR	Desvio padrão relativo
ECHA	European Chemicals Agency
FDA	Food and Drug Administration
ICH	The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
ISO	International Organization for Standardization
NBR	Norma Brasileira
PHMB:	Polihexametileno de biguanida
PIDAC	Provincial Infectious Diseases Advisory Committee
PG	Fosfatidilglicerol
PV	Protocolos de Validação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
WHO	World Health Organization
USP	United States Pharmacopeia
Vantocil	Polihexametileno de biguanida
VIM	Vocabulrio Internacional de Metrologia





## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO ESPECÍFICOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>LIMPEZA E DESINFECÇÃO EM AMBIENTES HOSPITALARES .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>AGENTES DE LIMPEZA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>TENSOATIVOS CATIÔNICOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1</b>	<b>QUATERNÁRIO DE AMÔNIO.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2</b>	<b>PHMB (POLIHEXAMENTILENO DE BIGUANIDA).....</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISE ESPECTROFOTÔMETRO UV/VIS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.1</b>	<b>SELETIVIDADE.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.2</b>	<b>LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.3</b>	<b>PRECISÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.3.1</b>	<b>REPETIBILIDADE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.3.2</b>	<b>PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.4</b>	<b>EXATIDÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.5</b>	<b>LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.1</b>	<b>SELETIVIDADE.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2</b>	<b>LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.3</b>	<b>PRECISÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.3.1</b>	<b>REPETIBILIDADE.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.3.2</b>	<b>PRECISÃO INTERMEDIÁRIA .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.4</b>	<b>EXATIDÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.5</b>	<b>LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>SELETIVIDADE.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>PRECISÃO .....</b>	<b>52</b>

<b>5.3.1</b>	<b>REPETIBILIDADE.....</b>	<b>53</b>
<b>5.3.2</b>	<b>PRECISÃO INTERMEDIÁRIA .....</b>	<b>53</b>
<b>5.4</b>	<b>EXATIDÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.5</b>	<b>LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>GLOSSÁRIO .....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES .....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE B – CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO A – LAUDO DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO B – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F-SNEDECOR .....</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO t-STUDENT. ....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento e evolução tecnológica nas últimas décadas, surgiram muitas demandas na área da qualidade, seja ela para cumprimento de exigência legal ou para desenvolvimento de novas tecnologias. Atualmente, existem milhões de laboratórios distribuídos pelo mundo em todos os segmentos: biotecnológicos, alimentícios, químicos, ambientais, análises clínicas, cosméticos, fármacos, saneantes, dentre outros. Dentro desses laboratórios, a todo momento existem demandas por análises precisas e seguras, onde os resultados dessas análises são parâmetros para tomadas de decisão. Seja para verificação da qualidade de um fármaco ou para um diagnóstico de saúde para um paciente, ou até mesmo para liberação de um desinfetante hospitalar para o mercado, por exemplo.

Os laboratórios em geral desenvolvem trabalhos minuciosos no intuito de entregar resultados precisos e seguros, através da calibração dos instrumentos de medição, metodologias de análises descritas em compêndios oficiais ou métodos validados, equipamentos qualificados, analistas treinados e capacitados, procedimentos descritos, dentre outros.

A Validação de Metodologia Analítica é o processo na qual o laboratório demonstra que o método é adequado ao “propósito”, no que diz respeito a resultados confiáveis e precisos, independente dos possíveis interferentes. A Validação do Método Analítico envolve a definição dos parâmetros a serem validados (identificação, quantificação de ativo/impurezas), por exemplo. A Validação de Metodologia Analítico envolve diversas resoluções e guias, porém a indústria saneante é regida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e segue a RDC N° 47, de 25 de Outubro de 2013 que prevê as Boas Práticas de Fabricação para Produtos Saneantes e para a Validação de Método Analítico RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017 que dispõe sobre Validação de Métodos Analíticos.

O não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação pode acarretar não conformidades que podem gerar suspensão do produto no mercado ou até mesmo interdição da fábrica. A Validação de Metodologia Analítica, é parte das Boas Práticas de Fabricação e garantindo que o produto que está saindo para o mercado seja eficaz.

A Boas Práticas de Fabricação para Fabricação de Produtos Saneantes, orienta que validação: “empresa deve conhecer seus processos a fim de estabelecer critérios para identificar a necessidade de validação” (RDC N° 47, de 25 de Outubro de 2013). A base do processo de validação envolve a calibração, qualificação e posteriormente as validações.

A Instrução Normativa n° 138 de 30 de março de 2022, dispõe sobre as Práticas de Fabricação

complementares às atividades de qualificação e validação, onde estão descritas as orientações para executar o processo, iniciando pelos Protocolos de Validação (PV).

Protocolos de Validação (PV) podem ser definidos como:

Documento que descreve as atividades a serem realizadas na validação/qualificação de um projeto específico, incluindo cronograma; as responsabilidades; os parâmetros críticos do processo; os atributos críticos de qualidade, critérios de aceitação associados para a aprovação da qualificação/validação de um processo produtivo; de um procedimento de limpeza; de um método analítico; de um sistema computadorizado; etc (INSTRUÇÃO NORMATIVA N°138 DE 30 MARÇO DE 2022).

A empresa deverá manter um programa de manutenção preventiva e calibração dos instrumentos de medição, no intuito de garantir a confiabilidade dos resultados. A calibração deverá ser realizada por uma empresa devidamente autorizada e a empresa contratante contará com um sistema de critério de aceitação para avaliação das calibrações (RDC N° 47, de 25 de Outubro de 2013).

As ações documentadas para as instalações, sistemas e equipamentos, são chamadas de qualificações. As qualificações são classificadas como: qualificação de projeto (avalia o projeto e documenta a aprovação), qualificação de instalação (avalia a instalação do equipamento/sistema), qualificação de operação (avalia a operação do equipamento/sistema) e a qualificação de desempenho (avalia o desempenho do equipamento/sistema) (McPOLIN, 2009).

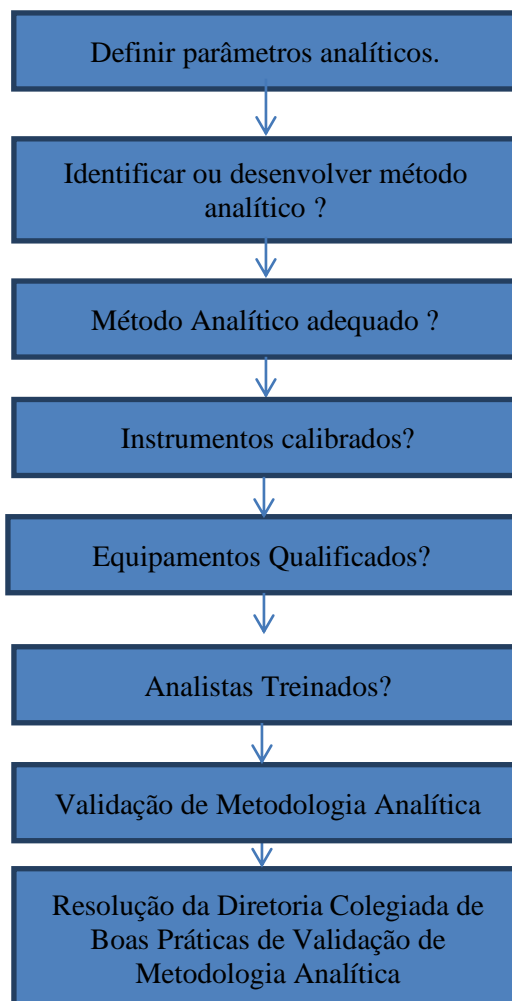
Os desenvolvimentos de métodos analíticos contribuem para a qualidade de serviços essenciais á sociedade e agrega dados para a ciência desenvolver novos trabalhos científicos.

Para a etapa de Validação do Método analítico é necessário planejamento, e o uso dos documentos (protocolos) descrevendo as etapas de abrangências, equipamentos, materiais, dentre outras particularidades (EURACHEN, 2019).

Após definição do método analítico a ser validado, o protocolo de validação deverá ser elaborado contemplando todos aspectos: parâmetros, critérios de aceitação e métodos de avaliação (ferramentas estatísticas a serem utilizadas), instrumentos qualificados, equipamentos qualificados, pessoal treinado, reagentes e grau de pureza (Figura 1) (SINDUSFARMA, 2016).

O presente trabalho, foi desenvolvido a partir da necessidade de análise quantitativa do ativo PHMB (Polihexametileno de Biguanida) no produto acabado em dois desinfetantes hospitalares fabricados na cidade de Uberaba-MG, por uma empresa que fornece para o mercado nacional produtos para higiene e limpeza profissional. Inicialmente, o desenvolvimento do método de análise começou na Universidade de Uberaba, pelo Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Química. Os primeiros testes para o desenvolvimento do método quantitativo foram realizados no

equipamento Espectrofotômetro UV-VIS da Universidade de Uberaba.



**Figura 1** – Fluxograma de Validação de Metodologia Analítica

**Fonte:** Autor, (2022)

A limpeza está associada com o bem estar e saúde do ser humano. Especialmente em ambientes hospitalares as técnicas de limpeza e desinfecção devem ser definidas e as equipes responsáveis treinadas, no intuito de garantir segurança e higiene para o ambiente. Além dos procedimentos e treinamentos, é imprescindível a utilização de produtos saneantes de qualidade como detergentes e desinfetantes específicos, por exemplo (SOUZA, *et. al*; 2021).

Neste contexto de limpeza e desinfecção, os desinfetantes hospitalares atuam como responsáveis na eliminação de cargas microbianas dentro das áreas hospitalares. Atualmente, tem-se detectado cepas bacterianas multirresistentes, o que tem exigido formulações de desinfetantes eficazes e desenvolvimento de técnicas de limpeza estratégicas.

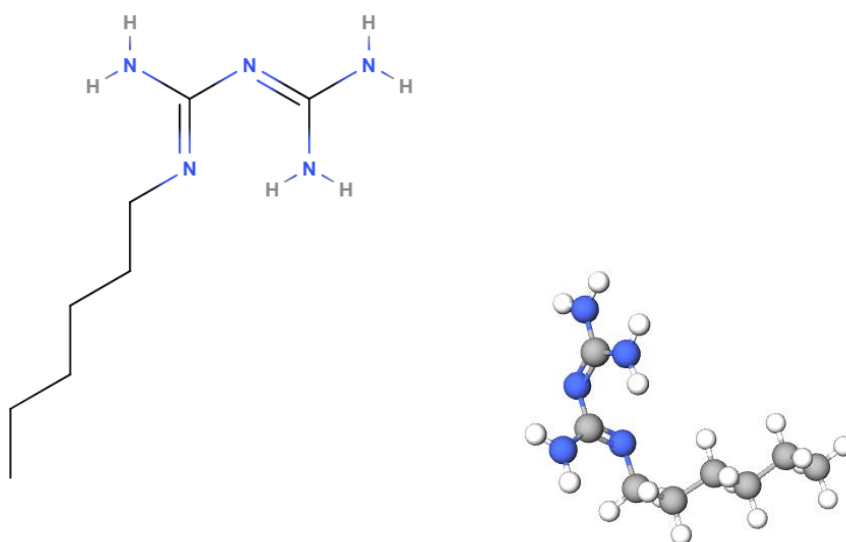
Desde a década de 1960, biocidas (substâncias ativas que exterminam, neutralizam, previnem

ou impedem a ação de microrganismos vivos indesejados, como fungos e bactérias), com caráter catiônico vem sendo usados na indústria saneante, dentre eles pode-se citar os quaternários de amônio, as bisbiguanidas e as biguanidas. A combinação do quaternário de amônio 5ª geração com o polihexametileno biguanida (PHMB), potencializou a atividade biocida sendo opção eficaz a diversas cepas bacterianas patogênicas presentes no ambiente hospitalar (MOORE; GILBERT; 2015).

Atualmente, devido o surgimento de novas cepas multi-resistente, o mercado tem desenvolvido novos “blends”, ou seja, mistura de ativos compatíveis para potencializar a ação desinfetantes direcionados para área hospitalar. A formulação dos desinfetantes hospitalares em estudo desenvolvidos ao longo deste trabalho, é uma combinação de ativos quaternário de amônio e o PHMB (Polihexametileno de Biguanida), testados e aprovados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Para o quaternário de amônio, existe o método de análise titulométrico desenvolvido e descrito na Farmacopéia Brasileira. Porém, para o ativo de PHMB (Polihexametileno de Biguanida) não, o que justifica o desenvolvimento e validação da metodologia de análise para o ativo.

O PHMB é uma solução aquosa de 20% de polihexametileno biguanida, estrutura de polímero composta por duas guanidinas unidas por um nitrogênio, podendo ser representada com uma faixa de massa molecular de 400 a 8000, com tamanho de  $n=2$  a  $n=40$ , comumente com a média  $n=11$  (Figura 2), (Regulation (EU) N° 528/2012, 2015).

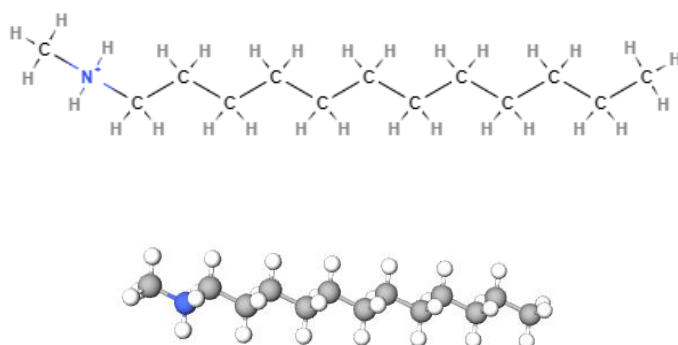


**Figura 2** – Estrutura do Polihexametileno de Biguanida.

**Fonte:** Molview, (2022)

A eficácia do PHMB, se deve a danos irreversíveis causados a componentes celulares, que atinge a membrana citoplasmática, causando a morte bacteriana. O PHMB interage com a membrana, principalmente com os fosfolípidos, o que ocasiona a letalidade da célula.

Os quaternários de amônio (Figura 3), são estruturas que apresentam pelo menos um nitrogênio com carga positiva, ligados por meio de ligações covalentes a outros quatro grupos alquil. Os compostos de quaternários não são sensíveis ao pH e o principal processo de síntese é pela rota nitrílica. Onde ocorre, a reação de um ácido graxo com amônia envolvendo altas temperaturas, permite a formação da nitrila, que posteriormente é convertida para amina primária, usando catalisador de cobalto ou níquel. Essa complexidade nas reações para obtenção dos quaternários, explica o fato dos preços dos tensoativos catiônicos serem normalmente mais altos (DALTIM, 2011).



**Figura 3** – Representação de uma cadeia de quaternário de amônio.

**Fonte:** Moliew, (2022).



## **2. OBJETIVO**

O objetivo dessa pesquisa foi desenvolver e validar o método de análise para quantificação do ativo PHMB (polihexametileno de biguanida) em desinfetantes hospitalares, usando o Espectrofotômetro UV/VIS.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Garantir o teor do ativo PHMB (Polyhexametileno de biguanida) nos lotes de produto acabado, no intuito de assegurar a qualidade e eficácia do produto.
- Avaliar a possível interferência dos outros componentes químicos contidos na formulação por meio do estudo estatístico desenvolvido.
- Empregar espectrofotometria para avaliar o atendimento às normas para quantificação de PHMB na formulação dos desinfetantes hospitalares.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIMPEZA E DESINFECÇÃO EM AMBIENTES HOSPITALARES

O desenvolvimento de cepas multiresistentes aos antibióticos em ambientes hospitalares, vem ganhando notoriedade no cenário da saúde. Estudos recentes, trazem evidências que o risco de pacientes imunosuprimidos adquirirem uma infecção com microrganismos multiresistentes é alto, se o processo de limpeza e desinfecção não forem adequados. Porém, a desinfecção com o ativo correto nas áreas hospitalares podem reduzir a carga microbiana, trazendo segurança e bem estar ao paciente (RUTALA; WEBER, 2019).

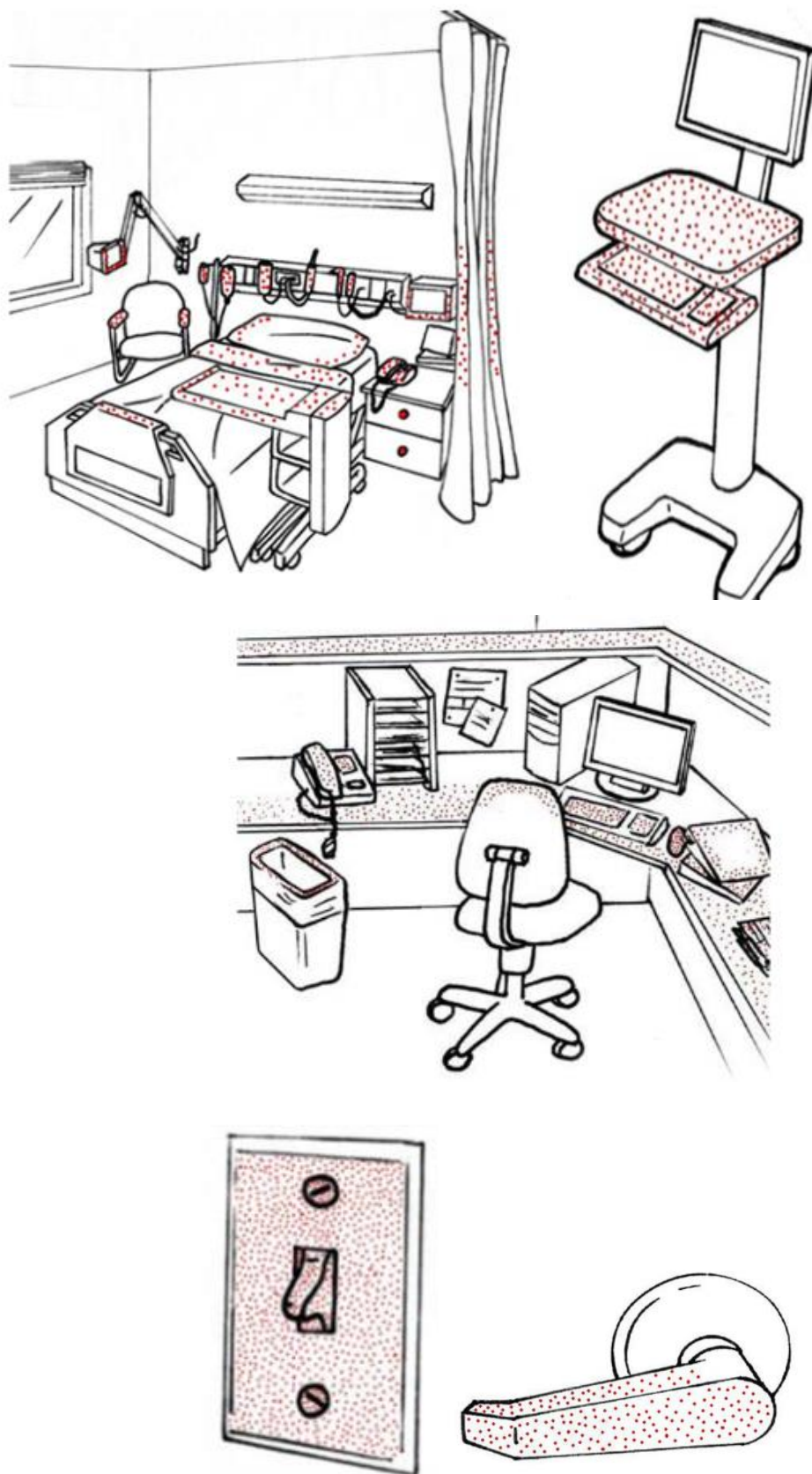
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), disponibiliza um guia de Limpeza e Desinfecção de Superfícies, com orientações estratégicas. O desenvolvimento de técnicas incorretas de limpezas e desinfecção de superfícies, pode favorecer a proliferação dos microrganismos.

Segundo o guia de (Segurança do Paciente em Serviços de Saúde Limpeza e Desinfecção de Superfícies, 2010), os setores com alto risco de contaminação podem ser classificadas como: áreas críticas, semicríticas e não críticas. As áreas críticas são definidas como as que existem o maior risco de transmissão, onde se realizam os procedimentos de riscos, como por exemplo, Unidade de Terapia Intensiva, Centro Cirúrgico e Centro de Obstetrícia. As áreas semicríticas são aquelas ocupadas por pacientes com baixa transmissibilidade e doenças não infecciosas, exemplo, enfermarias, apartamentos, ambulatórios e banheiros. As áreas não críticas, são as demais, exemplo, copa e vestiários (Figura 4).

No cenário hospitalar, existem legislações específicas para os critérios de avaliação dos fornecedores de produtos de limpeza a serem utilizados, no intuito de assegurar a qualidade e eficácia (formatar) da limpeza. Além, das orientações dos acessórios e equipamentos utilizados no processo.

O hospital contará com uma equipe SICH (Serviço de Controle de Infecção Hospitalar), responsável por selecionar, testar e aprovar os produtos saneantes, dentro do hospital (SOUZA, *et. al*; 2021). Dentre as diversas diretrizes legais a serem seguidas dentro dos hospitais, pode-se destacar as RDC n° 700 de 13 de Maio de 2022, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos.

Para um desinfetante hospitalar ser comercializado, o fabricante deverá envolver uma série de exigências regulatórias no intuito de assegurar a qualidade e desempenho do produto. Dentre diversas pode-se citar os registros com os laudos comprovando a eficácia frente a diversos microorganismos (Tabela 1), prevista a RDC n° 700 de 13 de Maio de 2022.



**Figura 4**– Locais em ambientes hospitalares considerados como propagador de microrganismos.

**Fonte:** PIDAC, (2018).

**Tabela 1** – Microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana RDC N° 700/2022

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>MICROORGANISMOS TESTE</b>
Desinfetante de nível intermediário	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> (BCG).
Desinfetante de alto nível	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> (BCG), <i>Mycobacterium massiliense</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> .

**Fonte:** (RDC n° 700 de 13 de Maio de 2022)

A (RDC N° 700 de 13 de Maio de 2022) define como desinfetante de nível intermediário: produto que destrói bactérias vegetativas, micobactérias, a maioria dos vírus e fungos em um período de tempo comprovado e desinfetante de alto nível: produto que destrói todos os microrganismos em um período de tempo comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos.

As limpezas podem ser classificadas como, limpeza concorrente: tem como finalidade organizar e limpar o ambiente, repor materiais e recolher resíduos, envolve a limpeza de pisos, janelas, equipamentos, portas, dentre outros. A limpeza terminal é mais completa, envolve todas as superfícies do ambiente. Geralmente, ocorre nos casos de altas hospitalares, óbitos e transferências de pacientes (Segurança do Paciente em Serviços de Saúde Limpeza e Desinfecção de Superfícies, 2010).

### 3.2 AGENTES DE LIMPEZA

Se antes o mercado consumia os sabões quase que exclusivamente, a evolução de tecnologia e desenvolvimento dos tensoativos nos últimos 60 anos, apresentou uma gama de diversidade de tensoativos ao mercado (DALTIM, 2011).

Os tensoativos podem ser aniônicos (quando dissociados em água adquire uma carga negativa), catiônicos (quando dissociados em água adquire uma carga positiva), não iônicos (cargas positivas e negativas dispersas pela molécula) e os anfóteros (se comportam como iônico ou catiônico dependendo do pH do meio) (DALTIM, 2011).

A limpeza pode ser definida como a ação por fricção de remoção de um corpo estranho como a poeira, material orgânico (sangue, secreção, microrganismos, etc.). E a desinfecção como processo

de remoção de microrganismos na forma vegetativa, por meio de agentes químicos ou físicos. A associação da limpeza e desinfecção, é de extrema importância, pois o material orgânico pode inativar o ativo do desinfetante (PIDAC, 2018).

Segundo RUTALA e WEBER (2019), define a diferença entre desinfetante e sanitizante, o desinfetante é um produto que mata todos os microrganismos patogênicos mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas e sanitizante: é um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde.

Os detergentes, tem o poder de estabilizar a emulsão do material orgânico e suspensão de óleos e graxas por interação das cargas dos tensoativos-sujidade até o enxágue, os tensoativos apresentam uma parte com característica apolar ligada a uma outra parte com característica polar (DALTIM,2011).

Diversos desinfetantes são utilizados na área hospitalar, estes incluem álcoois, cloro e compostos de cloro, formaldeído, glutaraldeído, orto-ftalaldeído, peróxido de hidrogênio, iodóforos, ácido peracético, fenólicos e compostos de quaternários de amônio (RUTALA;WEBER, 2019). Porém, esses produtos precisam estar devidamente registrados e cumprindo os requisitos da legislação.

Um estabelecimento de saúde deve ter procedimentos de limpeza e desinfecção bem escritos e definidos, atribuindo responsabilidades, frequência e nível de limpeza.

### **3.3 TENSOATIVOS CATIÔNICOS**

Os tensoativos catiônicos não apresentam uma boa solubilidade em água e estabilização da sujidade, porém apresentam alta adsorção em superfícies e atuação como bactericida. As membranas protéicas dos microrganismos apresentam superfícies carregadas negativamente e os tensoativos catiônicos apresentam forte adsorção impermeabilizando a superfície, causando a desnaturação da célula (DALTIM, 2011).

#### **3.3.1 QUATERNÁRIO DE AMÔNIO**

Dentro do grupo dos tensoativos catiônicos destaca-se o quaternário de amônio que, tem a fórmula comum  $R_4N^+X^-$ , composto de nitrogênio orgânico que faz as ligações covalentes com

outros quatro grupos orgânicos, heterocíclicos em que o nitrogênio está ligado a dois carbonos por ligação simples ou dupla. A rota de síntese dos quaternários disponíveis no mercado, parte de uma amina terciária e um agente alquilante, os mais utilizados são os cloreto dimetil, sulfato dimetil, sulfato dietil e cloreto de benzila (Tabela 2), envolvendo pressão e temperatura específica. Já as aminas comerciais são produzidas a partir de gorduras e óleos naturais, olefinas e ácidos graxos (KIRK-OTHMER,2004).

**Tabela 2** – Agentes Alquilantes usados na síntese dos quaternários.

Agente Alquilante	Fórmula Química	CAS NUMBER	Quaternário Final	
Cloridrato dimetil	$CH_3Cl$	74-87-3	$R_3N^+CH_3$	$Cl^-$
Sulfato dimetil	$(CH_3)_2SO_4$	77-78-1	$R_3N^+CH_3$	$CH_3SO_4$
Sulfato de dietil	$(CH_3CH_2)_2SO_4$	64-67-5	$R_3N^+CH_3$	$CH_3CH_2CSO_4$
Cloridrato de benzil	$C_6H_5CH_2Cl$	100-44-7	$R_3N^+CH_2C_6C_5$	$Cl^-$

Fonte: (KIRK-OTHMER, 2004)

### 3.3.2 PHMB (Polihexametileno de biguanida)

Os desinfetantes de caráter catiônico, vem sendo empregados na assepsia de ambientes hospitalares a várias décadas, e sua eficácia comprovada continua sendo a base da desinfecção desses ambientes. Dentre a diversidade de ativos que se encontra no mercado, pode-se citar, os compostos de quaternário de amônio, bisbiguanidas (clorexidina) e as biguanidas poliméricas (Vantocil) (MOORE; GIBERT, 2005).

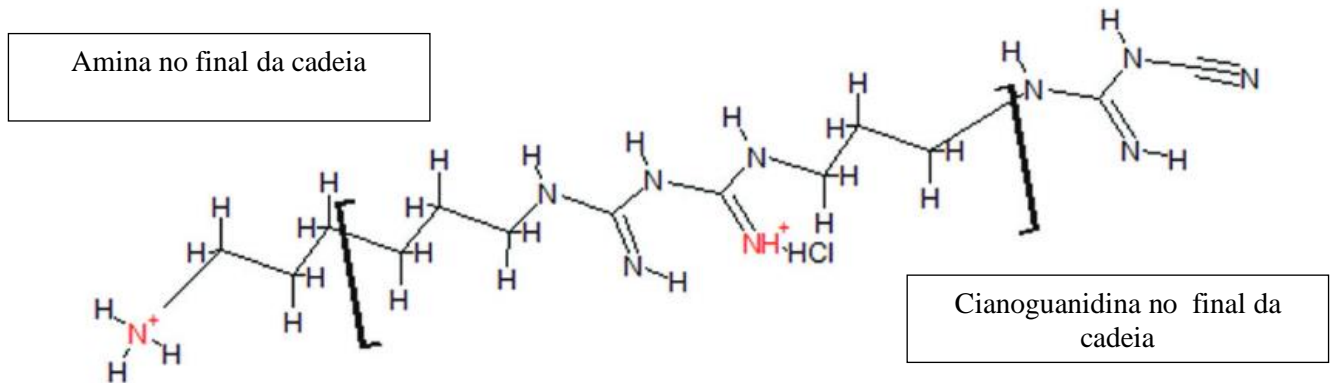
O amplo espectro antimicrobiano do grupo das biguanidas tem-se destacado como ativo usado nas formulações de sanitizantes. A biguanida é comercializada como Vantocil IB, é estudado e indicado como ativo de desinfetantes hospitalares para desinfecção de artigos semicríticos, pisos, paredes, dentre outros pelo amplo espectro contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, vírus e microrganismos resistentes a antibióticos (MOORE; GILBERT; 2005).

As primeiras sínteses, ocorreram no século XX, porém o processo complexo de síntese e a formação de aminas e cianoguanidina em sua posição final (Figura 5) impediram o uso farmacológico do ativo. Entretanto, uma síntese adicional levou ao desenvolvimento das bisbiguanidas, comercializadas como clorexidina (MOORE; GILBERT; 2005).

A clorexidina é empregada em lavagens cirúrgicas de mãos, usada como antisséptico em vários tratamentos de feridas, existe inúmeros trabalhos científicos provando sua eficiência frente a

microrganismos.

Em 2009, a Agência Europeia de Produtos Químicos aceitou o dossiê apresentado pela empresa Lonza, solicitando a inclusão do PHMB na lista de biocidas (ECHA,2015).



**Figura 5** - Biguanida com formação do grupo de amina e cianoguanidina

**Fonte:** (Moore; Gilbert, 2005)

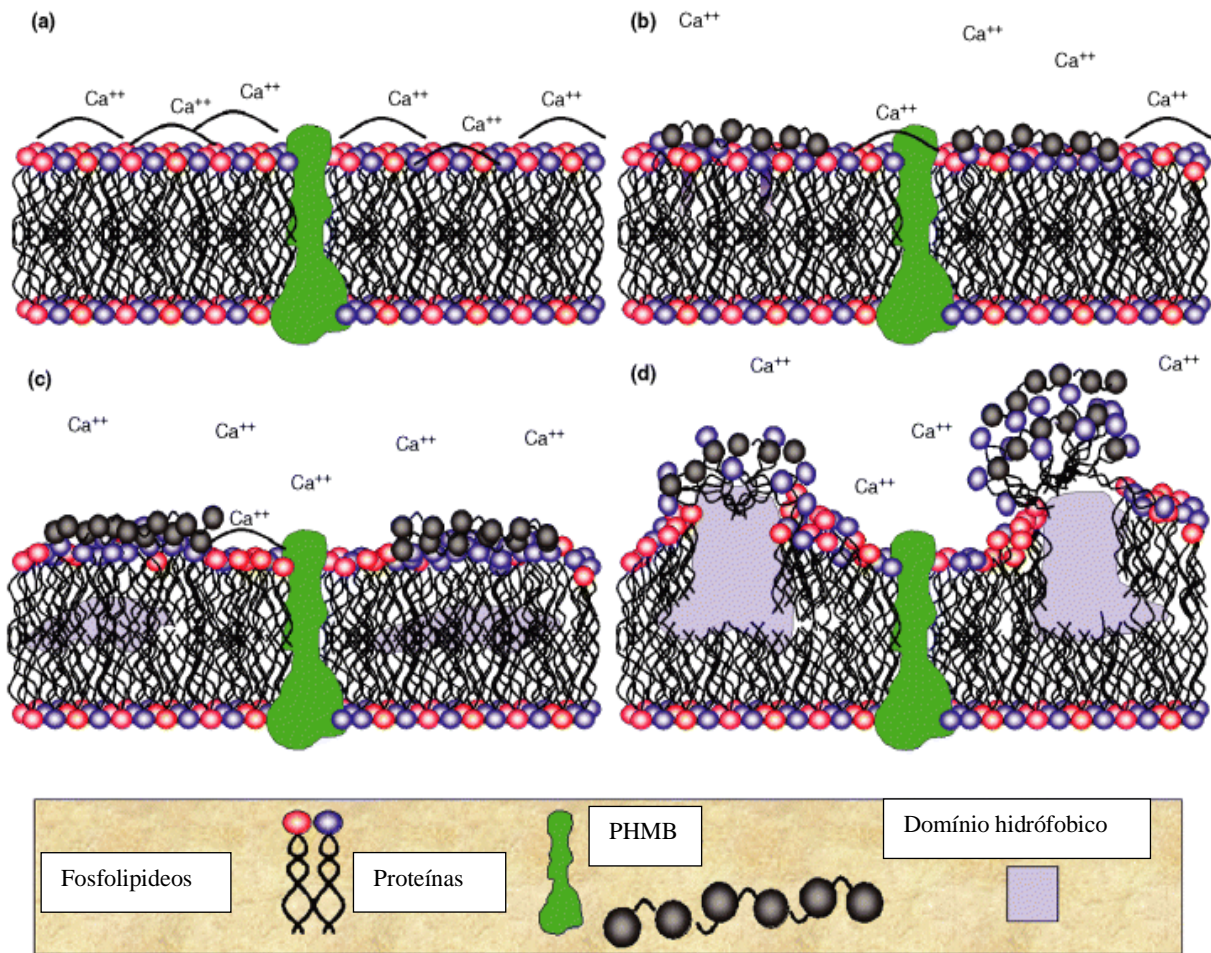
No mecanismo de atuação o PHMB é adsorvido na superfície da bicamada fosfatidilglicerol (PG), via interação com os grupos de 21 cabeças polares dos lipídios com os grupos biguanida. Essa interação provoca uma desorganização na bicamada de fosfatidilglicerol que por sua vez leva a aumento de fluidez, expansão lateral e maior permeabilidade. Essas alterações causam uma falha no mecanismo de defesa da célula e a ruptura da parede da mesma. O PHMB provoca na célula bacteriana a perda de substâncias de baixo peso molecular, como íons de potássio, cálcio e a inibição de enzimas responsáveis pela união da membrana, como por exemplo a ATPase. Subsequentemente há a ruptura da membrana plasmática que pode induzir à perda de substâncias macromoleculares e à precipitação das substâncias celulares (MELO,2018).

As superfícies externas das células bacterianas, possuem carga negativa muita das vezes estabilizadas por cátions divalentes como o  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (Figura 6 – a), o que justifica a afinidade entre biocidas catiônicos. O PHMB relativamente hidrofóbico, interage com a parede e a membrana deslocando os cátions bivalentes (Figura 6 –b e c), levando a dissolução da membrana bacteriana (Figura 6– d) (MOORE; GILBERT; 2005).

A interação do PHMB (polihexametileno de biguanida) e o quaternário de amônio potencializa a efetividade da interação com as células bacterianas, nas pesquisas desenvolvidas por McGeechan, (2012), os resultados com formulações contendo o mix de quaternário de amônio e PHMB, obtiveram resultados efetivos contra a cepa *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto em formulações contendo somente quaternário de amônio ou somente PHMB, obtiveram baixa atividade



antimicrobiana.



**Figura 6** - A presença do PHMB destabiliza os  $Ca^{2+}$  presente na célula, os grupos de hexametileno do PHMB são hidrofóbicos interagindo com os fosfolípidos que também são hidrofóbicos, levando a dissolução da membrana.

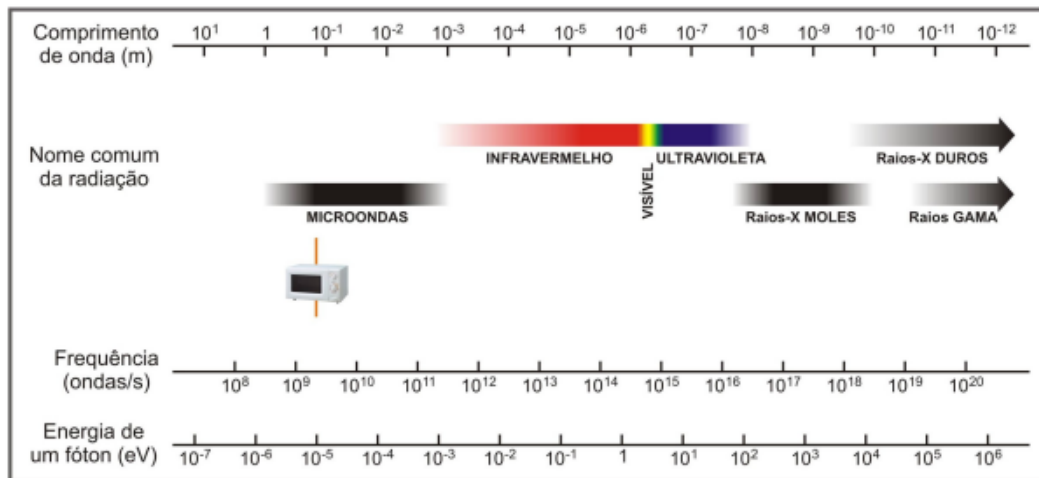
**Fonte:** (Moore; Gilbert, 2005)

### 3.4 MÉTODO DE ANÁLISE ESPECTROFOTÔMETRO UV/VIS

A espectrofotometria é uma técnica analítica muito utilizada para quantificar espécies químicas, baseia-se na medida da absorção da radiação eletromagnética nas regiões do visível e ultravioleta por espécie químicas em solução. As radiações eletromagnéticas são classificadas quanto ao comprimento de ondas, recebem denominações descritas na (Figura 7), a região cujas radiações são perceptíveis ao olho humano é chamada de visível (FILHO; *et. al.* 2010).

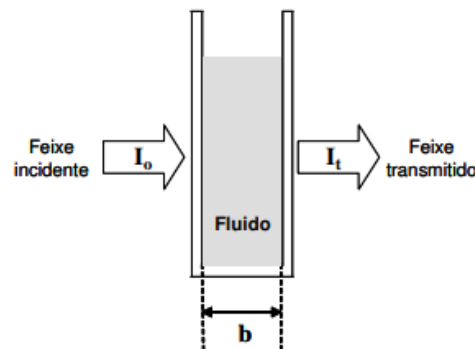
Quando um feixe de radiação de comprimento de onda definido e intensidade  $I_0$  incide sobre uma amostra, uma parte dessa energia é absorvida  $I_a$  e outra parte transmitida  $I_t$  e outra parte é refletida ou espalhada  $I_r$ , conhecida como a Lei de Beer (Figura 8).





**Figura 7** – Tipos de radiação de acordo com o comprimento de onda

Fonte: FILHO; *et. al.* (2010)



**Figura 8** – Feixe incidente

Fonte: FILHO; *et. al.* (2010)

Através dessas observações, uma equação foi expressa para relacionar absorção com a concentração Equação (1).

$$A = abc = \log \frac{I_0}{I_t} = -\log T \quad (1)$$

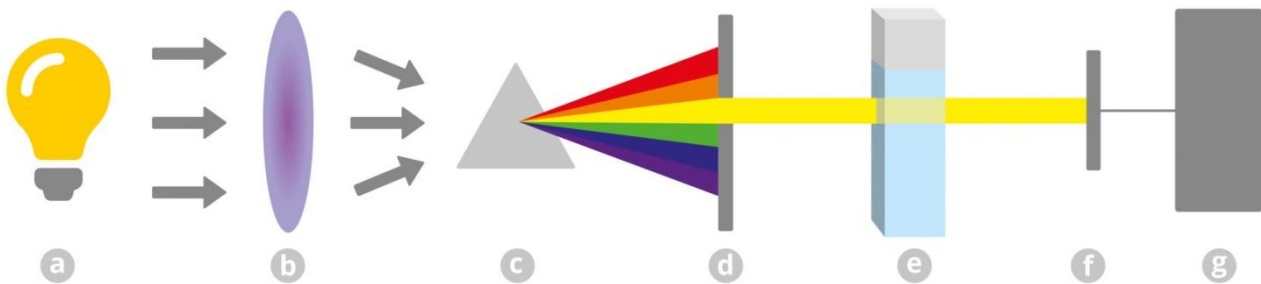
Sendo,  $A$  = absorvância;  $a$  = absortividade ( $L g^{-1} cm^{-1}$ );  $b$  = comprimento do caminho que a luz tem que atravessar na cuba ou qualquer recipiente onde esteja a solução (cm);  $c$  = concentração da espécie absorvente ( $g L^{-1}$ );  $I_0$  = feixe incidente;  $I_t$  = feixe transmitido;  $T$  = transmitância.

A absorvância de uma solução está relacionada com a transmitância. Quando a absorvância de uma solução aumenta, a transmitância diminui. Transmitância e absorvância tendem a ser grandezas complementares. Assim, sua soma (para a mesma energia e comprimento de onda incidente) é aproximadamente igual a 1, ou 100%. Se 90% da luz é absorvida, então 10% é transmitida (KASVI, 2018).

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (2)$$

Sendo,  $T$  = transmitância;  $I_0$  = feixe incidente e  $I_t$  = feixe transmitido

O princípio de funcionamento de um espectrofotômetro (Figura 9) pode ser resumido da seguinte forma: o equipamento que lê o sinal elétrico (detector) como absorvância, que é proporcional á concentração da substância absorvente existente na cubeta, realiza a leitura transmitindo o sinal para o computador (KASVI, 2018).



**Figura 9-** (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora (e) cubeta contendo solução, (f) detector, (g) leitor.

**FONTE:** (KASVI, 2018)

A cubeta, também chamada de célula, é o recipiente que contém a amostra, utilizada para permitir a leitura óptica. A de quartzo é usada para a região ultravioleta do espectro, já a de vidro é usada para a faixa visível e a cubeta de acrílico, para ensaios rápidos e menos exigentes (KASVI, 2018).

### 3.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

As metodologias analíticas são muito utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade como um meio de obter resultados de medições de concentrações de substâncias químicas, com objetivo de garantir a qualidade de um determinado produto. A confiabilidade dos resultados envolve além das metodologias de análises, diversos fatores como o uso de equipamentos e instrumentos:

balanças, vidrarias (balões, pipetas, buretas) e técnicas utilizadas (VOGEL, 2002).

A relação de confiabilidade dos resultados obtidos é tema de constantes discussões técnicas e tem se mostrado cada vez mais forte dentro da comunidade industrial, sendo chamado de Validação de Metodologias Analíticas (PEREZ,2010).

Segundo a NBR ISO/IEC (17025:2017), a validação é definida como “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”.

Os órgãos reguladores em diversos países que tratam das normalizações de metodologias analíticas e validações analíticas, são órgãos que conversam entre si, por exemplo: FDA (*Food and Drugs Administration*), WHO (*World Health Organization*), USP (*United States Pharmacopeia*), dentre outros.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) dispõe de uma Resolução Normativa que estabelece critérios sobre a validação de métodos analíticos, a RDC N°166 de 24 de Julho de 2017, que trata dos parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A Resolução Normativa disponibiliza dentro do corpo de texto no Anexo I , um quadro classificando os parâmetros a serem avaliados e estudados de acordo com a necessidade, descrito nesta dissertação através da (Tabela 3). Os parâmetros são descritos na sequência.

**Tabela 3** - Parâmetros a serem considerados na validação de metodologia de acordo com a RDC n° 166 de 24 Julho de 2017.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impureza		Doseamento -dissolução(quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	sim
Precisão Intermediária	não	sim <sup>(1)</sup>	não	sim <sup>(2)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não <sup>(3)</sup>	sim	não
Limite de Quantificação	não	sim	não	não <sup>(3)</sup>
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

**Fonte:** (RDC n° 166 , de 24 de julho de 2017)

<sup>(1)</sup> Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária

- (2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.
- (3) Pode ser necessário em alguns casos

### 3.5.1 SELETIVIDADE

Segundo Mettler Toledo, (2022), a “seletividade é a capacidade do método em medir inequivocadamente o analito na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra”.

O estudo de seletividade envolve a demonstração por meio de comparação dos resultados de análises de preparações contendo o analito de estudo, contra amostras nos quais o analito de interesse está ausente, nomeada como matriz (SINDUSFARMA, 2016).

Segundo a (RDC nº 166 de 24 de julho de 2017), a matriz pode ser definida como “composição que mimetiza a amostra sem a presença do analito” e o analito como “substâncias ou conjunto de substâncias de interesse que se pretende identificar ou quantificar”. Neste estudo: desinfetante concentrado e desinfetante diluído, o analito de interesse é o PHMB (polihexametileno de biguanida), uma das matérias-primas (ativo) presentes na formulação.

Para a análise dos resultados, aplica-se dois testes de hipóteses no intuito de avaliar a homogeneidade das variâncias e comparação de médias por nível de concentração (COSTA, 2022).

O teste F de Snedecor foi desenvolvido inicialmente por Ronald Alymer Fisher em 1922, porém foi tabelado por Snedecor em 1934, que tem como objetivo comparar a variância de dois grupos, mostrando se há diferença entre os grupos. O  $F_{cal}$  é a razão entre a variância de dois grupos, sendo  $F_{cal} > 1$ , ou seja, F é a razão da maior variância pela menor variância; Equação (3).

$$F_{cal} = \frac{Si_1^2}{Si_2^2} \quad (3)$$

Sendo,  $Si_1 =$  desvio padrão do grupo 1 ;  $Si_2 =$  desvio padrão do grupo 2.

Os valores de  $F_{tab}$  são tabelados em função dos números de graus de liberdade, estimativas de variância e níveis de probabilidades, consultar tabela com  $p=0,05$ , o valor de p representa a probabilidade da hipótese nula ser verdadeira. Posteriormente, compara-se  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  para aceitação ou rejeição da hipótese:

**Hipótese Nula**  $F_{cal} < F_{tab}$  : as variâncias são estatisticamente iguais, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração.

**Hipótese alternativa**  $F_{cal} > F_{tab}$  : as variâncias são estatisticamente diferentes, isto é, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração.

Com os resultados obtidos pelo teste F-Snedecor, aplica-se o teste T-Student para analisar as médias. Quando se aceita a hipótese nula e recusa-se a hipótese alternativa do teste F-Snedecor, para o  $t_{cal}$  usa-se as Equação (4) e Equação (5), e quando rejeita-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese alternativa, usa-se a Equação (6) (REGO, 2017).

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S_{ag} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (4)$$

$$S_{ag} = \sqrt{\frac{[(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2]}{(n_1+n_2-2)}} \quad (5)$$

Sendo,  $S_{ag}$  = desvio padrão agrupado;  $n_1$  = número de amostras do grupo 1 ;  $n_2$  = número amostras do grupo 2 ;  $S_1$  = desvio padrão do grupo 1 ;  $S_2$  = desvio padrão do grupo 2;  $\bar{x}_1$  = média aritmética do grupo 1 ;  $\bar{x}_2$  = média aritmética do grupo 2 ;

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (6)$$

Posteriormente, aplica-se o teste t-Student, para o  $t_{tab}$  consultar a tabela t-Student, para uma significação de  $p=0,05$ .

**Hipótese Nula**  $t_{cal} < t_{tab}$  : as médias são estatisticamente iguais, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração.

**Hipótese alternativa**  $t_{cal} > t_{tab}$  : as médias são estatisticamente diferentes, isto é, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração.

### 3.5.2 LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO

Linearidade de um procedimento analítico refere-se à habilidade dentro da faixa de trabalho em obter resultados nos quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ICH, 2022).

Segundo (BELOUFA, *et. al.* 2016), a “regressão linear avalia a relação entre duas variáveis

ajustando uma equação linear para os dados observados”. A equação da regressão linear pode ser representada pelas Equação (7), Equação (8) e Equação (9).

$$y = a + bx \quad (7)$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (8)$$

$$b = \frac{n \sum(xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (9)$$

Sendo,  $x =$  *variável independente*,  $y =$  *variável dependente*,  $b =$  *coeficiente angular* e  $a =$  *intercepto (valor de  $y$  quando  $x = 0$ )*.

Observa-se através do valor que o  $R^2$ , a linearidade de um modelo. O critério de aceitação descrito na RDC nº 166 de 24 de julho de 2017, descreve um  $R^2 > 0,990$ . Entretanto, deve-se avaliar a distribuição dos dados, ou seja, se a variabilidade dos erros é constante ou não se correlaciona, espera-se que o modelo linear seja constante.

A homocedasticidade pode ser definida como a avaliação da variação dos dados ( $x$ ) em torno da linha de regressão, influenciada pela aleatoriedade dos erros. Um modelo heterocedástico, indica que o modelo linear não se ajusta de forma correta aos dados observados (BUSSAB; MORETTIN, 2017).

### 3.5.3 PRECISÃO

Segundo o (INMETRO, 2020) as três maneiras mais comuns de se expressar a precisão é através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo expressa pelo desvio padrão e o desvio padrão relativo.

**Desvio padrão:** medida da dispersão dos valores no conjunto de amostras, Equação (10).

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (10)$$

Sendo  $X_i =$  valor individual dos dados,  $\bar{X} =$  média,  $n =$  número de elementos do conjunto de

dados.

**Desvio padrão relativo:** é o desvio padrão expresso em porcentagem Equação (11), muito usado para representar os critérios de aceitação da exatidão, precisão e repetibilidade.

$$\% DPR = \frac{S}{\bar{X}} 100 \quad (11)$$

Sendo  $S$  = Desvio padrão,  $\bar{X}$  = média aritmética

### 3.5.3.1 REPETIBILIDADE

Condição de medição em um conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (VIM,2012).

Os resultados obtidos através das Equação (10) e Equação (11), são comparados com a (Tabela 4) sugerida como critério de aceitação.

**Tabela 4** – Critério de aceitação para Repetibilidade.

Analito %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR %
100	1	100%	1,3
10	$10^{-1}$	10%	1,9
1	$10^{-2}$	1%	2,7
0,1	$10^{-3}$	0,1%	3,7
0,01	$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	$10^{-6}$	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	$10^{-7}$	100 ppb ( $\mu$ g/kg)	15
0,000001	$10^{-8}$	10 ppb ( $\mu$ g/kg)	21
0,0000001	$10^{-9}$	1 ppb ( $\mu$ g/kg)	30

**Fonte:** AOAC, (2016)

### 3.5.3.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças (VIM,2012). A avaliação da precisão intermediária, ocorre de forma a avaliar se houve diferença estatística entre as mudanças, se recomenda a avaliação pelo ANOVA.

### 3.5.4 EXATIDÃO

Exatidão refere-se a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, demonstrado através da Equação (12), onde as amostras podem ser fortificadas com o analito pelo menos em três (3) diferentes concentrações (baixa, média e alta).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) 100 \quad (12)$$

sendo:  $C_1$  = Concentração do analito na amostra fortificada (produto comercial com excesso do analito), ou seja, para o desinfetante diluído “solução Amostra 4” e para o desinfetante concentrado “solução Amostra 5”;  $C_2$  = Concentração do analito na amostra não fortificada, produto comercial, ou seja, para o desinfetante diluído “solução Amostra 1” e para o desinfetante concentrado “solução Amostra 2”;  $C_3$  = Concentração do analito adicionado à amostra fortificada (apenas dissolvido em água), ou seja, “solução de Amostra 3”.

Os resultados obtidos através da Equação (12) são comparados com a (Tabela 5).

### 3.5.5 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2022).

Limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade



do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis(ICH,2022).

**Tabela 5** – Critérios de aceitação para recuperação média.

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

**Fonte:** AOAC, (2016)

Em uma análise é importante conhecer a menor concentração detectada pelo método analítico, o termo “limite de detecção” indica que é suficiente fornecer a distinção do sinal do branco e analito. O limite de detecção pode ser definido como a concentração de um elemento que dá um sinal igual a três vezes o nível sinal-ruído da linha base ( $S_0$ ), representado pelo desvio padrão Equação(13).

O limite de quantificação pode ser estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco e estabelecendo a concentração mínima em que a espécie de interesse pode ser quantificada com confiabilidade. Em geral, considera-se aceitável uma relação sinal-ruído de 10:1, conforme Equação (14).

$$LD = 3S_0 \quad (13)$$

sendo:  $LD$  = Limite de detecção ;  $S_0$  = Desvio padrão das leituras

$$LQ = 10 S_0 \quad (14)$$

sendo:  $LQ$  = Limite de quantificação;  $S_0$  = Desvio padrão das leituras.

A validação de metodologia analítica, envolve a conformidade do processo e é exigida quando o método de análise não está descrito nos compêndios oficiais. A confiabilidade do método é demonstrada através da estatística.

No meio estatístico, os erros são parâmetros de observação decisivos nos resultados, e podem ser divididos em erros sistemáticos e erros aleatórios, o primeiro está relacionado aos erros operacionais, erros instrumentais e de reagentes e erros de método, já os erros aleatórios, são aqueles que ocorrem de forma que não pode ser controlada, isso devido a dificuldade de detecção das variações de medidas de uma amostra, realizadas por um analista (VOGEL, 2002).

Uma consequência do erro sistemático é acurácia que é definida como sendo a concordância entre uma média e o valor verdadeiro ou mais provável da grandeza. A acurácia pode ser medida pelo método absoluto e o método comparativo (VOGUEL, 2002)

Existem formas de reduzir os erros sistemáticos partindo de calibração dos instrumentos, determinação do branco de uma amostra, análise e controle, o uso de métodos de análise independentes, determinações paralelas, adição padrão entre outras (VOGEL,2002).

Segundo a (RDC N° 166 DE JULHO DE 2017), “a utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela ANVISA, requer a realização de uma validação analítica”.

Além da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), também disponibiliza procedimentos para validação de metodologias analíticas. O INMETRO, é uma agência vinculada ao Ministério da Economia, que possui competências de executar políticas nacionais de metrologia e avaliação de conformidade (Conforme a ABNT NBR ISO 17025:2017 ); inspecionar normas técnicas e legais quanto às unidades de medida, métodos e instrumentos de medição, por exemplo (PEREZ, 2010).

No Brasil, o único órgão reconhecido para acreditação, é o Cgcre (Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro). A acreditação pode ser definida como o reconhecimento formal da competência dos Organismos de Avaliação da Conformidade (AOC), é uma ferramenta internacional para gerar confiança na atuação das organizações.

Para o estudo de validação analítica de cada parâmetro estatístico, é necessário aplicar os testes estatísticos e interpretar.

A metodologia de determinação de teor do PHMB em dois desinfetantes hospitalares, foi desenvolvida em laboratório e os parâmetros de desempenho para validação baseada no DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020) e RDC N°166/2017, com o objetivo de obtenção de resultados com qualidade e confiabilidade. Os testes estatísticos foram realizados pelo Excel.

O comprimento de onda usada, 237 nm foi recomendado pelo fabricante. Entretanto,

(KUSTERS, *et. al.* 2013), desenvolveu uma pesquisa para validação de método cromatográfico e avaliou-se uma faixa ótima para leitudo do PHMB (Polihexametileno de biguanida) 237nm.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

- Balança analítica Balança Semi Analítica – resolução 0,001g - com Capela Marte;
- Balão (100 mL e 1 L);
- Pipetas ( 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL);
- Espectrofotômetro UV-VIS Bel MODELO UV-M51 (190 nm – 1000 nm) (Figura 10);
- Cubeta de Quartzo;



**Figura 10** – Espectrofotômetro UV/VIS Bel Engineering.

**Fonte:** Autor, (2022)

### 4.2 MÉTODO

As faixas de trabalho das concentrações estudadas, foram definidas baseadas na igualdade da concentração em p.p.m do analito *versus* a quantidade da concentração do analito em p.p.m no desinfetante diluído e desinfetante concentrado. A base de cálculo foi realizada a partir de 0,5 g de analito (PHMB), indicativo do fornecedor da matéria prima.

O laudo de calibração do espectrofotômetro está anexado no Anexo A – Laudo de Calibração do Espectrofotômetro, as tabelas com todos os resultados obtidos, estão descritas na seção Apêndice A – Resultados dos testes. Detalhou-se para cada parâmetro estatístico (seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão e exatidão), o método de preparo das soluções. O branco considerado para todas as análises foi água destilada, e todas as leituras foram

realizadas na faixa de 237 nm.

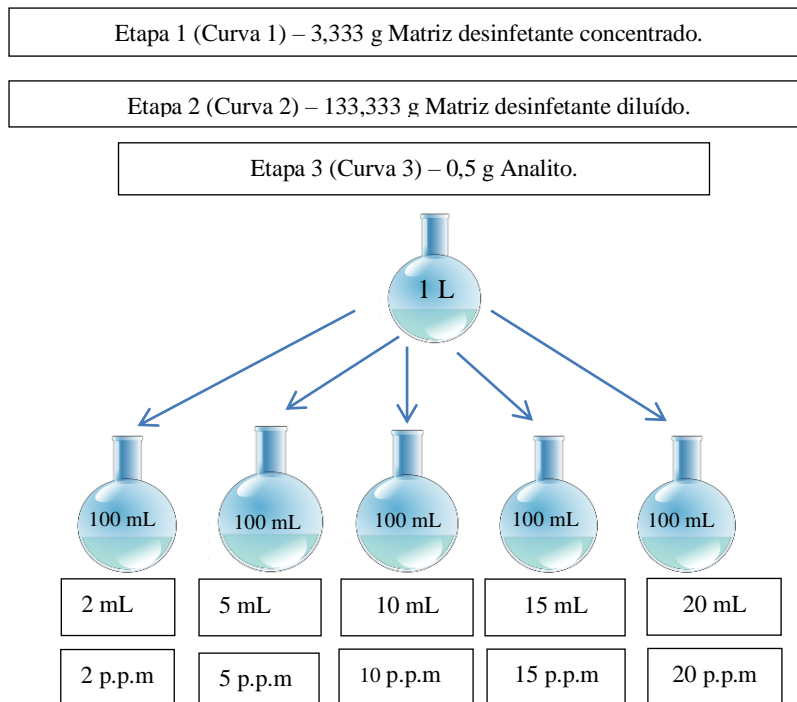
O cálculo de preparo das soluções (analito, desinfetante diluído e desinfetante concentrado) estão disponíveis no APÊNDICE B – CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES.

Etapa 1 ) Pesou-se 3,333 g desinfetante concentrado em um béquer, transferiu-se a amostra para um balão de 1000 mL, completando o balão com água até o menisco. Transferiu-se alíquotas de 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 20 mL para 7 balões de 100 mL completando-os com água destilada (Figura 11). Realizou-se a leitura na faixa de 237 nm para cada concentração em réplicas

Etapa 2 ) Pesou-se 133,333 g desinfetante diluído em um béquer, transferiu-se a amostra para um balão de 1000 mL, completando o balão com água até o menisco. Transferiu-se alíquotas de 0,5 mL, 1 mL 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 20 mL para 5 balões de 100 mL completando-os com água destilada (Figura 11). Realizou se a leitura na faixa de 237 nm para cada concentração em réplicas.

Etapa 3) Pesou se 0,5 g do analito (PHMB) em um béquer, transferiu-se a amostra para um balão de 1000 mL, completando o balão com água até o menisco. Transferiu-se alíquotas de 0,5 mL, 1 mL 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 20 mL para balões de 100 mL completando-os com água destilada (Figura 11) . Realizou se a leitura na faixa de 237 nm para cada concentração em réplicas

#### 4.2.1 SELETIVIDADE:

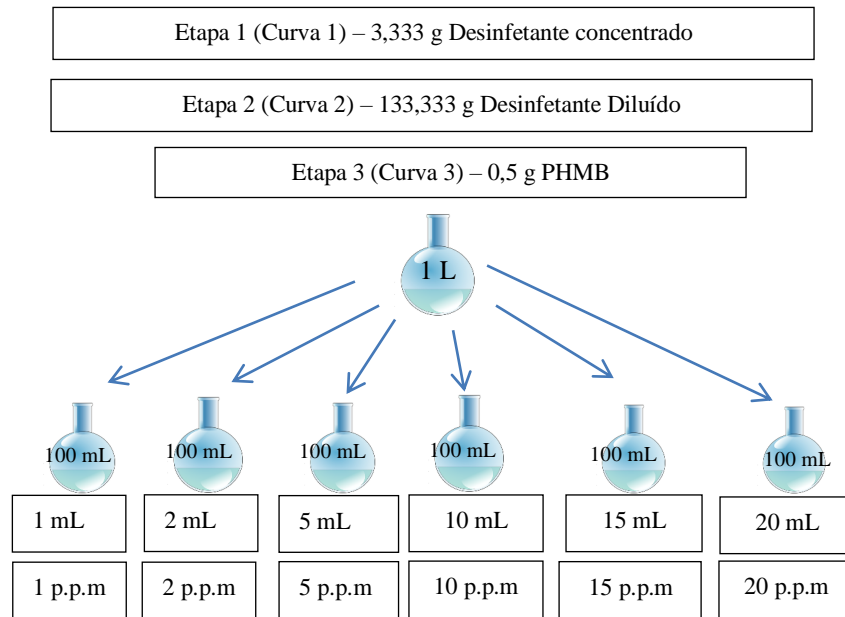


**Figura 11** – Etapa 1, 2 e 3 para Seletividade.

**Fonte:** Autor (2022).

Para cada concentração, realizou-se as leituras em 7 (sete) réplicas conforme orientações da ANVISA e aplicou-se testes estatísticos de hipótese para avaliação entre as variâncias (F-Snedecor) e médias (t-Student) dos dois grupos (matriz desinfetante concentrado *versus* analito) e (matriz desinfetante diluído *versus* analito), a (Figura 11) representa a construção das soluções para leitura no espectrofotômetro.

#### 4.2.2 LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO



**Figura 12** – Etapa 1, 2 e 3 para Linearidade e Faixa de Trabalho.

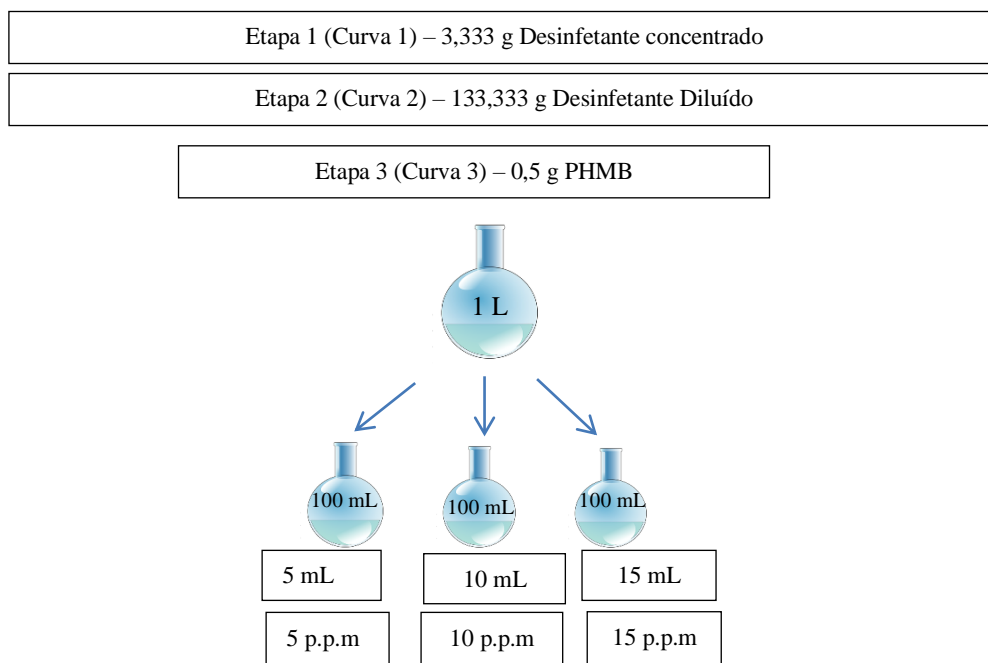
**Fonte:** Autor (2022)

Para cada concentração, realizou-se as leituras em 3 (três) réplicas conforme orientações da ANVISA, realizando o estudo estatístico da linearidade na faixa de trabalho para cada um dos grupos, a (Figura 12) representa a construção das soluções para a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.2.3 PRECISÃO

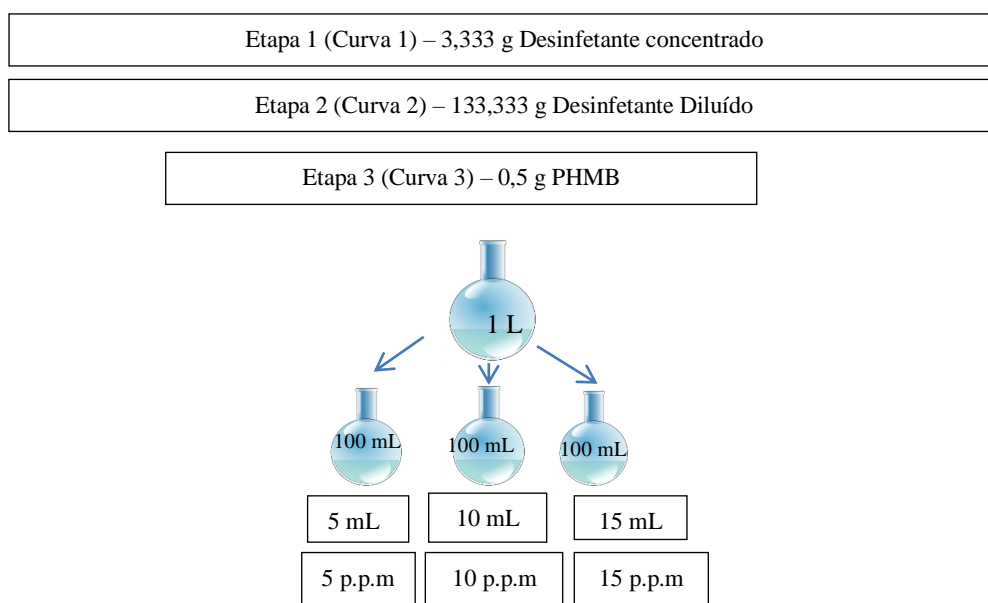
**4.2.3.1 Repetibilidade:** parâmetro com estratégia de análise realizada no mesmo dia, com um analista e usando o mesmo equipamento. Realizou-se as leituras em 6 (seis) réplicas por concentração conforme orientações da ANVISA, calculou-se a média, desvio padrão e desvio padrão relativo, tendo como critério de aceitação os valores da (Tabela 4), a (Figura 13), representa a construção das soluções para a leitura no espectrofotômetro.

**4.2.3.2 Precisão Intermediária:** as análises para o parâmetro precisão intermediária utilizou-se dois analistas em dois dias diferentes, usando as mesmas condições analíticas, ou seja, mesmo método analítico e mesmo equipamento. Realizou-se as leituras em 6 (seis) réplicas por concentração conforme orientações da ANVISA e aplicou-se o programa estatístico ANOVA para avaliação estatística do método comparando analistas e dias, a (Figura 14), representa a construção das soluções para a leitura no espectrofotômetro.



**Figura 13** – Etapa 1, 2 e 3 para Repetibilidade.

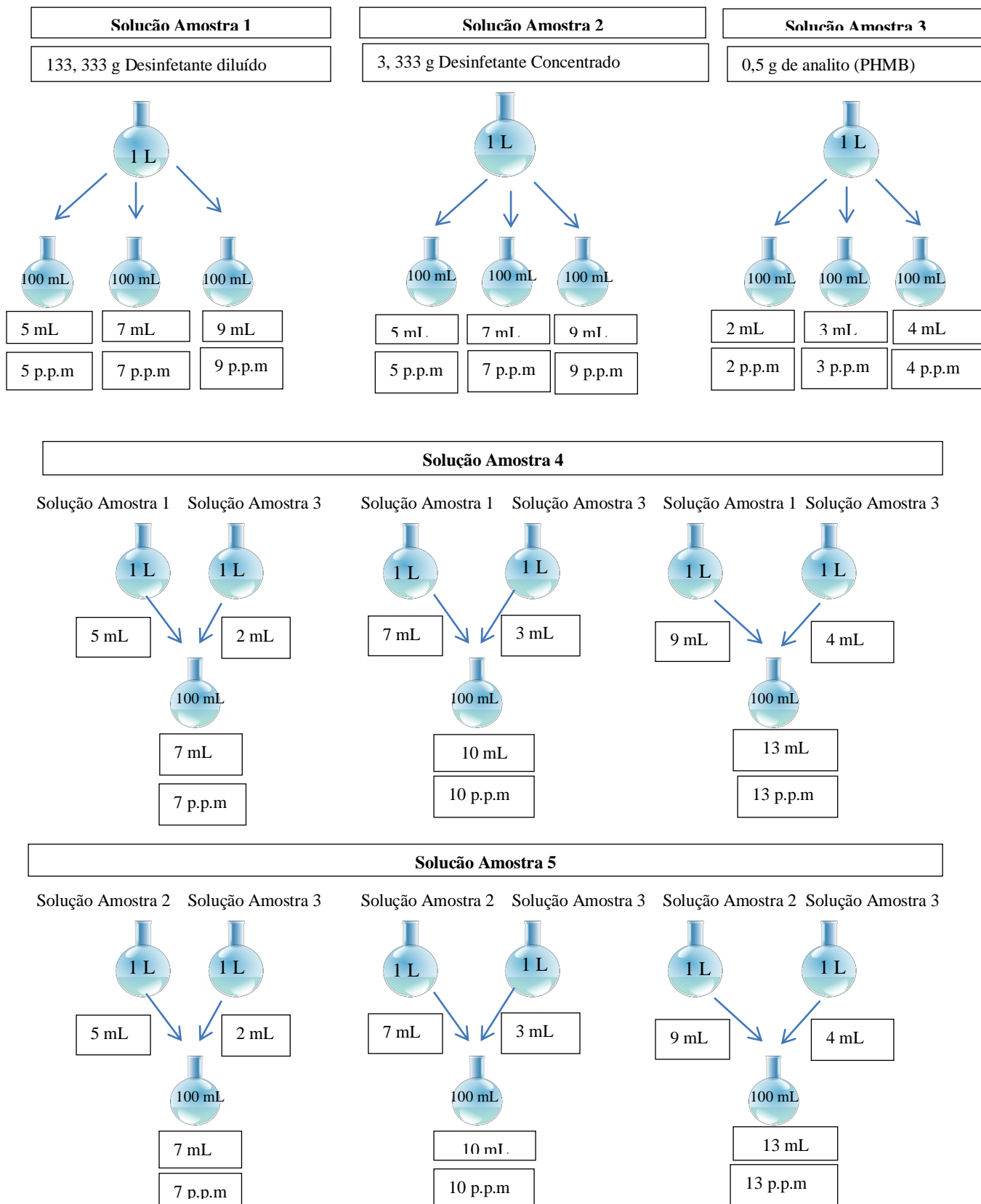
**Fonte:** Autor (2022)



**Figura 14** – Etapa 1, 2 e 3 para Precisão Intermediária.

**Fonte:** Autor (2022).

#### 4.2.4 EXATIDÃO

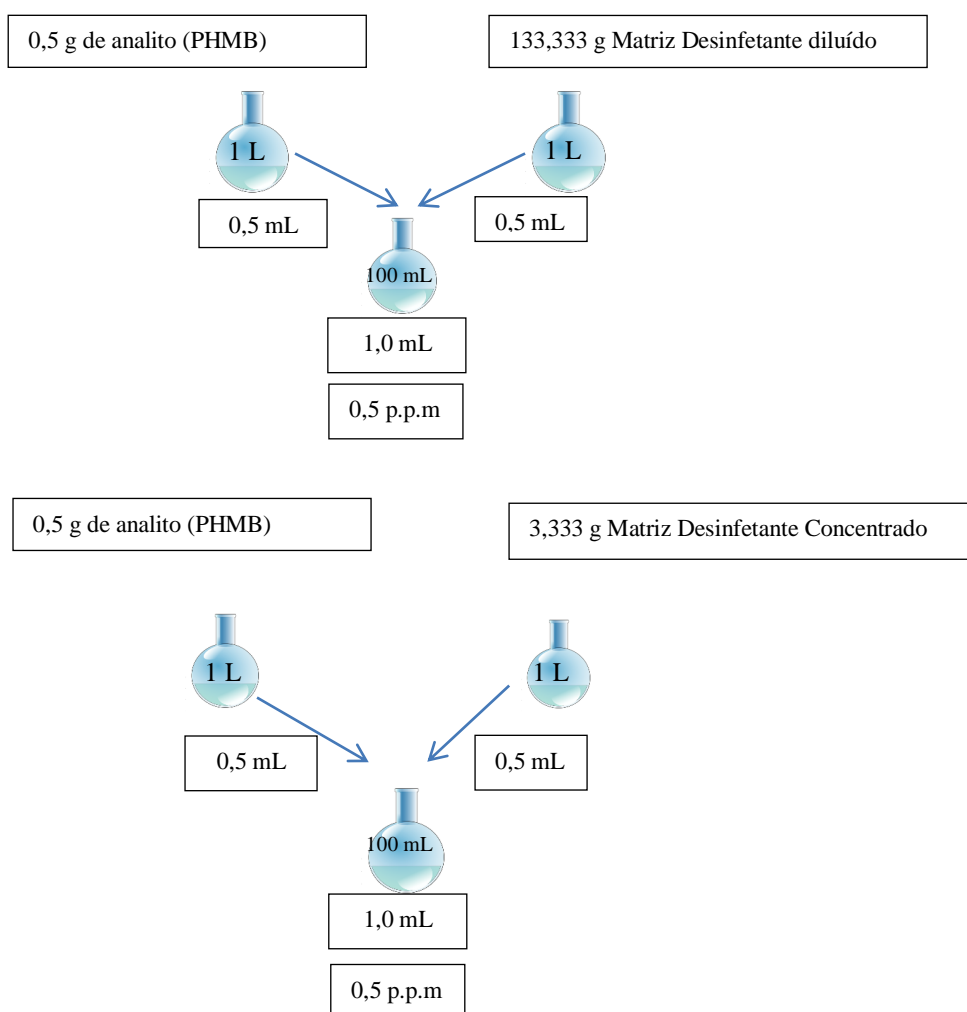


**Figura 15** – Testes para Exatidão.

Fonte: Autor (2022).

Para verificação da exatidão, realizou-se as leituras em 7 (sete) réplicas, conforme orientações da ANVISA e posteriormente, os cálculos da recuperação (%) do desinfetante diluído e desinfetante concentrado utilizando-se da Equação (12) e compara-se com os critérios de aceitação descritos na (Tabela 5). A (Figura 15), representa a construção das soluções para a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.2.5 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO



**Figura 16**– Testes para limite de detecção e limite de quantificação.

**Fonte:** Autor (2022)

Para a determinação do limite de detecção e limite de quantificação aplicou-se a Equação (13) e Equação (14). A (Figura 16), representa a construção das soluções para a leitura no espectrofotômetro.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seletividade

A seletividade do método analítico espectrofométrico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (INMETRO, 2020).

Com os resultados obtidos para a solução analítica da matriz desinfetante diluído *versus* solução analítica do analito (Tabela 6), e solução analítica da matriz desinfetante concentrado *versus* solução analítica do analito (Tabela 7), aplicou-se os testes estatísticos de hipótese entre os grupos para avaliação da seletividade. Para as concentrações da cada grupo estudado ( matriz desinfetante diluído, matriz desinfetante concentrado e analito), plotou-se a equação da reta e o  $R^2$  (Tabela 8) juntamente com a as retas (Figura 17) e (Figura 18). Os resultados de todas réplicas estão descritos nas (Tabela 22) e (Tabela 23), no APÊNDICA A – Resultados dos testes.

Para a avaliação das variância entre os grupos aplicou-se o teste F-Snedecor e para avaliação das médias entre os grupos, aplicou-se teste t-Student, com um nível de confiança de 95% ( $p=0,05$ ), para ambos os testes. Observou-se que para todas as concentrações da matriz desinfetante diluído *versus* analito (Tabela 6), o  $F_{cal} > F_{tab}$  (variâncias estatisticamente diferentes). Para obtenção do  $F_{cal}$ , utilizou-se a Equação (3), para o  $F_{tab}$  utilizou-se a Tabela Distribuição F de Snedecor a 5% ( $p=0,05$ ). Posteriormente, aplicou-se o teste t-Student, para avaliar as médias e observou-se que, para todas as concentrações da matriz desinfetante diluído o  $t_{cal} > t_{tab}$ , ou seja, estatisticamente as médias entre os grupos são diferentes. Para o cálculo do  $t_{cal}$ , utilizou-se a Equação (6) e para o  $t_{tab}$  utilizou-se a Tabela Distribuição t-Student a 5% ( $p=0,05$ ), Para o  $t_{tab}$ , disponível no ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO t-STUDENT e para o  $F_{tab}$  ANEXO B – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F-SNEDECOR.

Para a matriz desinfetante concentrado, observou-se que para as concentrações de 2 p.p.m e 15 p.p.m o  $F_{cal} < F_{tab}$  (variâncias estatisticamente iguais), e para as demais concentrações  $F_{cal} > F_{tab}$  (variâncias estatisticamente diferentes). Para o cálculo de  $F_{cal}$  utilizou-se a Equação (3) para o  $F_{tab}$  utilizou-se a Tabela Distribuição F de Snedecor a 5% ( $p=0,05$ ) (Anexo). Posteriormente, aplicou-se o teste t-Student, para avaliar as médias e observou-se que, para todas as concentrações da matriz desinfetante concentrado o  $t_{cal} > t_{tab}$ , ou seja, estatisticamente as médias são diferentes. Para o cálculo do  $t_{cal}$ , utilizou-se a Equação (6) para todas concentrações, exceto para as concentrações de 2 p.p.m e 15 p.p.m, onde o  $F_{cal} < F_{tab}$ , para essas duas concentrações utilizou-se

Equação (4) e Equação (5). Para o  $t_{tab}$  utilizou-se a Tabela Distribuição t-Student a 5% ( $p=0,05$ ).

Entretanto, observa-se através das linearidades obtidas (Tabela 8) que a análise é seletiva (Figura 17) e (Figura 18) para o analito PHMB, porém foi evidenciado que para as duas matrizes (desinfetante diluído e desinfetante concentrado) que existe o efeito matriz sobre os resultados do método. Ou seja, os padrões devem ser preparados na mesma matriz que as amostras.

**Tabela 6** – Resultados estatísticos para matriz desinf. diluído *versus* analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Variância ( $s_i^2$ )	$F_{cal}$	$F_{tab}$	$t_{cal}$	$t_{tab}$
2	Matriz Desinf. diluído	0,0029	0,000001	8,000	4,284	95,079	1,895
	Analito	0,0999	0,000006				
5	Matriz Desinf. diluído	0,0130	0,000008	10,4000	4,284	65,420	1,895
	Analito	0,2540	0,000087				
10	Matriz Desinf. diluído	0,0226	0,000001	17,615	4,284	386,6853	1,943
	Analito	0,5187	0,000011				
15	Matriz Desinf. diluído	0,0420	0,000005	41,1939	4,284	139,956	1,943
	Analito	0,7843	0,000192				
20	Matriz Desinf. diluído	0,0558	0,000005	49,105	4,284	173,851	1,943
	Analito	1,0593	0,000229				

**FONTE:** Autor, (2022)

**Tabela 7** – Resultados estatísticos para matriz desinf. Conc. *versus* analito.

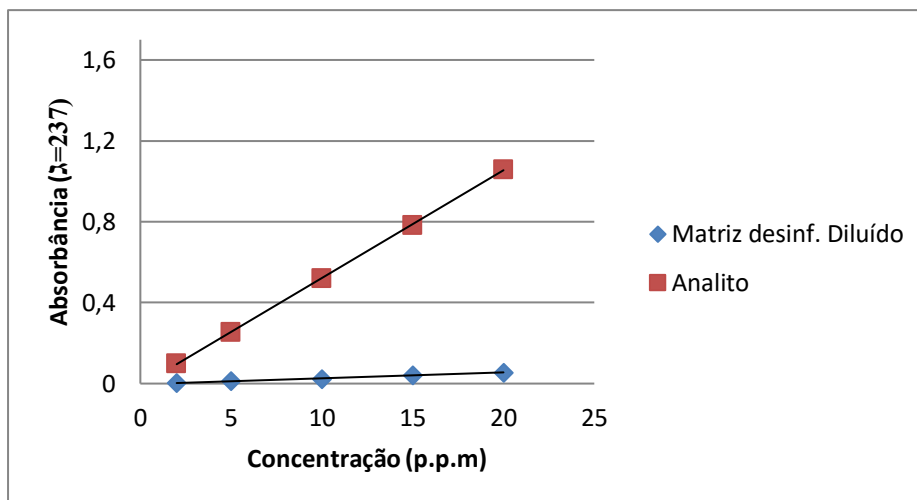
Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Variância ( $s_i^2$ )	$F_{cal}$	$F_{tab}$	$t_{cal}$	$t_{tab}$
2	Matriz desinf. Conc.	0,1862	0,000068	1,059	4,2839	20,513	1,7823
	Analito	0,0973	0,000064				
5	Matriz desinf. Conc.	0,4404	0,000016	5,5488	4,2839	48,770	1,8595
	Analito	0,2540	0,000087				
10	Matriz desinf. Conc.	0,8279	0,000016	11,4849	4,2839	57,4645	1,8946
	Analito	0,5227	0,000182				
15	Matriz desinf. Conc.	1,2184	0,000073	2,6351	4,2839	70,5347	1,7823
	Analito	0,7843	0,000192				
20	Matriz desinf. Conc.	1,6031	0,001407	6,158	4,2839	35,5743	1,8595
	Analito	1,0593	0,000229				

**FONTE:** Autor, (2022)

**Tabela 8** – Equações da reta dos resultados estatísticos referentes as (Tabela 6) e (Tabela 7).

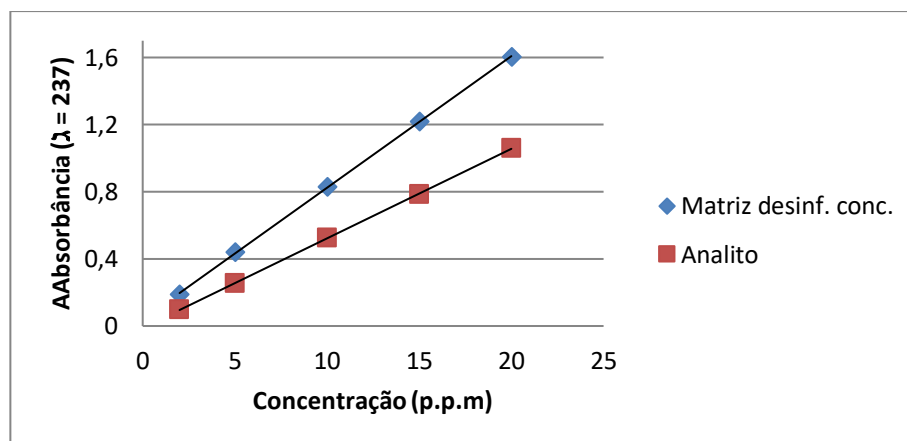
Solução	Equação da reta	$R^2$
Matriz desinfetante diluído (Tabela 6)	$Y = 0,0533x + 0,0108$	0,9999
Analito (Tabela 6)	$Y = 0,0029x - 0,0032$	0,9911
Matriz desinfetante concentrado (Tabela 7)	$Y = 0,0784x + 0,0395$	0,9998
Analito (Tabela 7)	$Y = 0,0534x - 0,0116$	0,9999

**FONTE:** Autor, (2022)



**Figura 17** – Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinf.diluído *versus* analito.

**Fonte:** Autor, (2022)



**Figura 18** – Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinf.conc *versus* analito.

**Fonte:** Autor ,(2022)

## 5.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (INMETRO, 2020). Os resultados para o estudo da linearidade (Tabela 9) devem ser avaliados de acordo com a relação das leituras de absorvâncias obtidas com as concentrações estudadas (Figura ~15), avalia-se o valor de  $R^2$  obtido e comparar com o critério de aceitação, outra avaliação a ser realizada é a dispersão dos resultados, em gráficos (Figura 16).

**Tabela 9** – Resultados estatísticos para o desinf. diluído, desinf. conc. e o analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Desinf. diluído		Desinf. concentrado		Analito	
	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão
1	0,046	0,0005	0,050	0,0005	0,040	0,00057
2	0,091	0,0015	0,101	0,0020	0,105	0,0066
5	0,236	0,0020	0,262	0,0011	0,273	0,0051
10	0,475	0,0017	0,502	0,0106	0,546	0,0101
15	0,715	0,0060	0,728	0,0026	0,828	0,0215
20	0,966	0,0095	0,998	0,0104	1,100	0,0298

**Fonte:** Autor ,(2022)

As equações da reta foram determinadas pelo estudo de regressão linear, avaliando se os parâmetros estatísticos dos dados obtidos para cada concentração *versus* absorbância(Tabela 9). Observa-se que o modelo é linear, tanto para o desinfetante diluído, desinfetante concentrado e o analito. Isso devido ao valor de  $R^2$  estar dentro dos critérios de aceitação da ANVISA, que predetermina que seja maior do que 0,990 com um nível de significância de 5%. Para o desinfetante diluído obteve-se o valor de  $R^2 = 1$  ; para o desinfetante concentrado obteve-se o valor de  $R^2 = 0,9993$  e para o analito obteve-se  $R^2 = 0,9999$ . As equações da reta estão descritas na (Tabela 10).

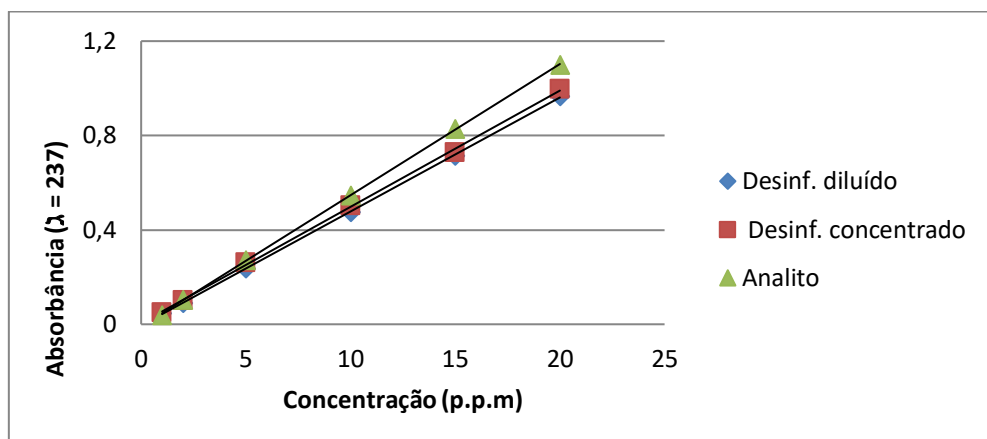
A pesquisa de validação de metodoliga desenvolvida por (Rego, 2017), adotou cinco pontos (concentrações) de estudo para avaliação da linearidade, construiu-se a curva de calibração simples usando o método de regressão linear simples, avaliando-se o  $R^2$ , distribuição dos valores, gráfico de resíduos, e concluindo-se que as faixas de trabalhos adotadas foram consideradas lineares.

Os resultados das leituras individuais dos testes estão descritos nas (Tabela 24) para desinfetante diluído, (Tabela 25) para o desinfetante concentrado e (Tabela 26) para o analito PHMB (*polihexametileno de biguanida*), no APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES.

**Tabela 10** – Resultados estatístico para os estudos de linearidade para o desinf. diluído, desinf. concentrado e analito (PHMB)

Produto	Equação reta	$R^2$	F
Desinfetante diluído	$y = 0,0485x - 0,0057$	1	86983,7
Desinfetante concentrado	$y = 0,0492x + 0,0053$	0,993	5968,87
Analito ( PHMB)	$Y = 0,0556x - 0,0087$	0,9999	43912,13

**FONTE:** Autor, (2022)



**Figura 19** – Retas da regressão linear para os casos estudados: desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito.

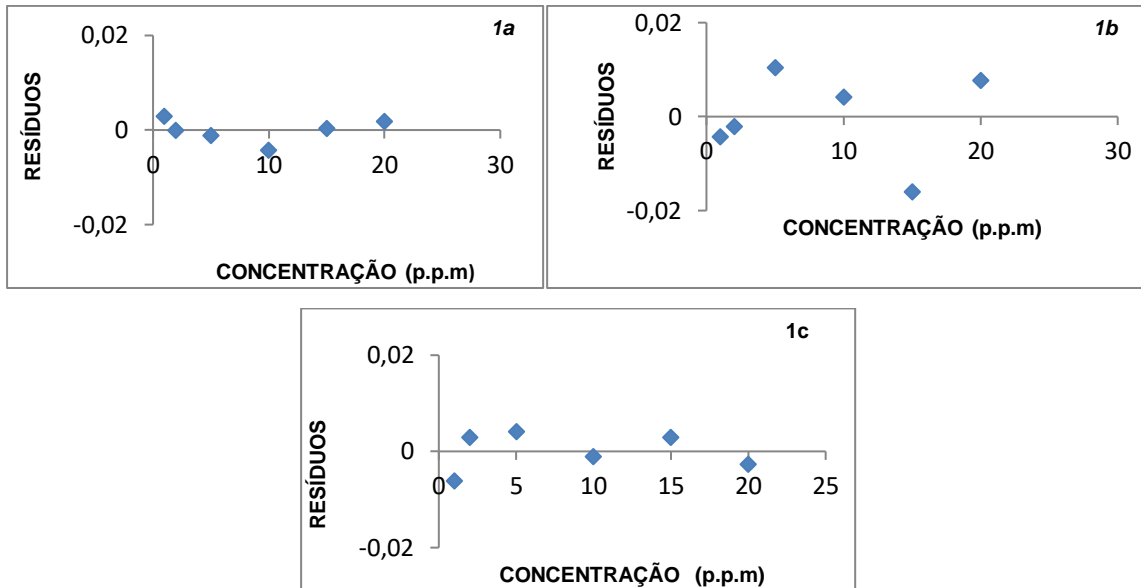
**Fonte:** Autor, (2022)

Avaliou-se ainda, a homocedasticidade dos dados da análise dos resíduos demonstrados a partir da (Figura 20) para o desinfetante diluído, desinfetante concentrado e para o analito (PHMB). Constatou-se, a homocedasticidade dos resíduos nos três casos, ou seja, não há tendência na diferença entre o valor esperado e o valor calculado pela equação da reta de regressão.

Realizou-se o teste ANOVA para o desinfetante diluído, para o desinfetante e analito, e observou-se que  $F_{cal} > F_{tab}$  de significação nos três casos, indicando significância estatística para o modelo estatístico.

Usando os resultados obtidos para o desinf. diluído, observa-se a linearidade e a homocedasticidade dos pontos, ou seja, a precisão das medidas é independente do valor da concentração.

Segundo os estudos de validação de método analítico para fármacos conduzidos por (GERLIN, 2021), as curvas analíticas obtidas atenderam o parâmetro linearidade. Todas as curvas estudadas obtiveram  $R^2 > 0,99$ ; como prevê a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). No trabalho o autor trabalha com limite de detecção e quantificação juntamente com a linearidade.



**Figura 20** – Plotagem dos resíduos do desinfetante diluído (1a); desinfetante concentrado (1b) e analito (PHMB) (1c).

**Fonte:** Autor, 2022

A faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2022). A faixa de interesse do método analítico, está centralizada em cada um dos casos estudados, sendo estratégia das pesquisas.

### 5.3 Precisão

Segundo INMETRO, (2020) a precisão pode ser expressa de três maneiras: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

#### 5.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões e material de referência. Refere-se a variação das medidas feitas repetidamente com o mesmo instrumento, o mesmo dia e analista ou seja, mesmas condições de análises (INMETRO,2020).

Para o desinfetante diluído observou-se que para as concentrações de 2 p.p.m obteve-se um DPR% de 3,215%; para 5 p.p.m DPR% 1,312 e para 10 p.p.m DPR% 0,741 (Tabela 11), se comparar esses valores com o critério de aceitação descritos na (Tabela 4) (1 p.p.m = 11% - 10 p.p.m = 7,3%),

observa-se que todos os valores estão dentro dos critérios de aceitação. Para o desinfetante concentrado e para o analito (Tabela 11) observa-se, o mesmo comportamento, todas as concentrações atendem o critério de aceitação se comparado com a (Tabela 4). Os resultados das réplicas estão descritos no APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES, (Tabela 27), (Tabela 28) e Tabela (29).

Para o estudo de validação Rego (2017), definiu-se os critérios de aceitação de acordo com a necessidade do método, por exemplo, o critério de aceitação do DPR (Desvio Padrão Relativo) foi definido como  $\geq 20\%$ . O critério de aceitação apresentado e sugerido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO ( Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Metrologia ), são baseado na AOAC (Association of Analytical Chemists), na qual foi adotado para esta pesquisa.

**Tabela 11** – Desvio padrão relativo obtido para o desinfetante diluído, desinfetante concentrado e o analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	desinf. diluído			desinf. concentrado			Analito		
	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
	(Absorbância $\lambda = 237$ )			(Absorbância $\lambda = 237$ )			(Absorbância $\lambda = 237$ )		
2	0,099	0,003	3,215	0,106	0,0010	0,514	0,118	0,004	3,101
5	0,244	0,003	1,312	0,266	0,0008	0,306	0,292	0,001	0,375
10	0,480	0,003	0,741	0,524	0,00687	1,311	0,573	0,002	0,342

**FONTE:** Autor, (2022)

### 5.3.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária é parte do parâmetro precisão e pode ser avaliada por meio da variação das condições da execução das análises, adotou-se :

- Dois analistas diferentes;
- Dois dias diferentes.

O estudo estatístico aplicado ANOVA, demonstrou através dos valores que não houve diferença estatística entre analistas e dias, isso porque  $F > F_{crit}$  ; com o p-valor  $< 0,05$  para o desinfetante diluído demonstrado através da (Tabela 12), o que se repete para o desinfetante concentrado (Tabela 13) e analito (Tabela 14). Os resultados das réplicas estão descritos no

APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES, (Tabela 30), (Tabela 31) e Tabela (32).

**Tabela 12** – Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o desinf. diluído.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Concentrações	0,0002	3	6,68E-05	9,906568	2,13E-05	2,7581
Analistas e Dias	1,938401	2	0,969201	143822	3,8E-111	3,1504
Interações	0,005047	6	0,000841	124,8344	5,45E-32	2,2540
Dentro	0,000404	60	6,74E-06			
Total	1,944053	71				

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 13**– Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o desinf. concentrado.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Concentrações	0,0001	3	3,82E-05	5,123043	0,003199	2,7581
Analistas e Dias	2,1337	2	1,06683	143198,6	4,3E-111	3,1504
Interações	0,0012	6	0,000196	26,30686	4,23E-15	2,2540
Dentro	0,0004	60	7,45E-06			
Total	2,1354	71				

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 14** – Estudo estatístico na avaliação da precisão intermedária para o analito.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Concentrações	0,0003	3	9,76E-05	26,281	5,59E-11	2,7580
Analistas e Dias	2,530	2	1,265073	340632,9	2,2E-122	3,1504
Interações	0,0004	6	7,25E-05	19,5126	1,78E-12	2,2540
Dentro	0,0002	60	3,71E-06			
Total	2,5311	71				

**Fonte:** Autor, (2022)

#### 5.4 Exatidão

Para o testes de exatidão realizou-se a recuperação em níveis de fortificações de 7 p.p.m , 10 p.p.m e 13 p.p.m. Verificou-se as leituras separadamente de cada nível de fortificação no intuito de identificar possíveis interferentes. Procedeu-se com a leitura das soluções fortificadas com o analito, para o desinfetante diluído e para o desinfetante concentrado.

Segundo a (RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017), a exatidão deve ser verificada em no minimo 3 níveis( baixo, médio e alto) em triplicata, avaliando a recuperação média. Para o critério de aceitação definiu-se a ( Tabela 5) recomendada pelo (AOAC, 2016), sugerida pelo INMETRO.

Os resultados expressos nas (Tabelas 15) e (Tabela 16) são das soluções preparadas



individualmente com a média, desvio padrão, desvio padrão relativo e nível de fortificação (p.p.m) calculado através da equação da reta ( Tabela 17). Os resultados de cada réplica estão descritos no APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES, (Tabela 33), (Tabela 34) e (Tabela 35).

**Tabela 15** – Resultados para a Solução Amostra 1 e Solução Amostra 2.

Nível de fortificação (p.p.m)	desinf. diluído = Solução Amostra 1			desinf. concentrado = Solução Amostra 2				
	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Nível de fortificação (p.p.m) calculado	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Nível de fortificação (p.p.m) calculado
5	0,250	0,008	0,275	5,022	0,274	0,001	0,178	4,994
7	0,342	0,001	0,366	6,964	0,378	0,003	0,775	7,018
9	0,440	0,008	0,157	9,024	0,480	0,002	0,466	8,996

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 16** – Resultados para Solução Amostra 3.

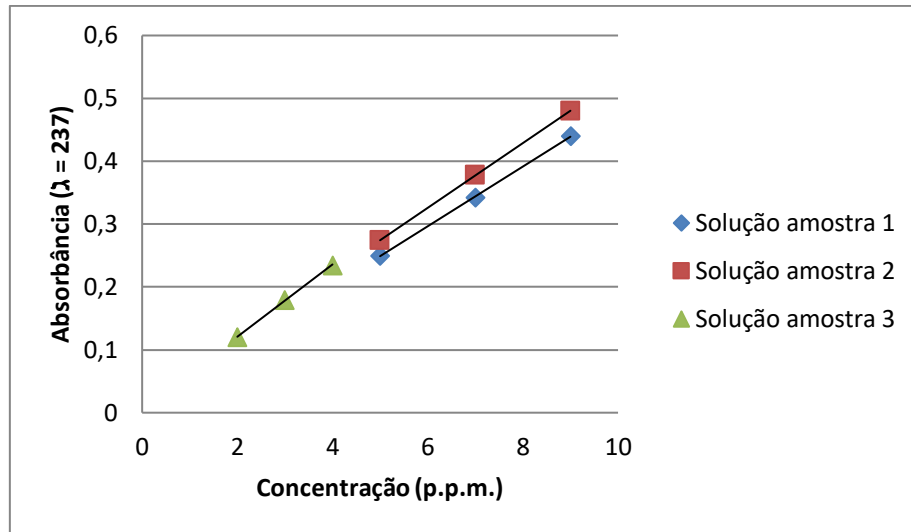
Nível de fortificação (p.p.m)	Analito = Solução Amostra 3			
	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Nível de fortificação (p.p.m) calculado
2	0,120	0,00053	0,444	1,986
3	0,180	0,00053	0,296	3,030
4	0,235	0,00048	0,207	3,988

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 17** – Equação da reta para Solução Amostra 1, Solução Amostra 2 e Solução Amostra 3

Produto	Equação reta	$R^2$
Solução Amostra 1	$y = 0,0515x + 0,0168$	1
Solução Amostra 2	$y = 0,0475x + 0,0115$	0,9997
Solução Amostra 3	$y = 0,0575x - 0,0058$	0,9994

Fonte: Autor, (2022)



**Figura 21** – Plotagem do gráfico Solução Amostra 1, Solução Amostra 2 e Solução Amostra 3

**Fonte:** Autor, (2022)

Para as matrizes Solução Amostra 4, representada pela adição de concentrações diferentes da Solução de Amostra 1 + Solução de Amostra 3, os resultados estão na (Tabela 18) e Solução Amostra 5 representada pela adição de concentrações diferentes da Solução de Amostra 2 + Solução de Amostra 3, os resultados estão na (Tabela 19), com o nível de fortificação calculado através da equação da reta (Tabela 20). Os resultados obtidos para %Recuperação de cada concentração foram comparados com os critérios de aceitação descritos na (Tabela 5). Os resultados de leitura das réplicas estão no APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES, (Tabela 36) e (Tabela 37).

Para a solução de Amostra 4 que representa o desinfetante diluído fortificado com analito, realizou-se os cálculos de % recuperação utilizando a Equação (12) para as concentrações estudadas. Por exemplo, para a concentração de 5 p.p.m da solução Amostra 1 obteve-se o nível de fortificação calculada (p.p.m) de 5,022 p.p.m (Tabela 15), que representa  $C_2$ . Na (Tabela 18) Solução Amostra 4, utilizou-se a solução de representada por  $C_2$  e adicionou-se a solução Amostra 3 de 2 p.p.m representada pelo analito  $C_3$ , obtendo-se através da equação da reta (Tabela 17) o nível de fortificação calculado de 6,998 p.p.m, representado  $C_1$ , a partir desses valores realizou-se o cálculo de % recuperação. Aplicou-se o mesmo princípio para as demais concentrações e posteriormente para a o desinfetante concentrado.

Os testes de recuperação foram satisfatórios se comparados a (Tabela 5). Por exemplo, na (Tabela 19), primeira linha observa-se a amostra fortificada teoricamente em 7 p.p.m, com o cálculo da média, desvio padrão, nível de fortificação calculado com o uso da equação da reta (Tabela 20) de 6,988 p.p.m e % Recuperação de 98,975%. Ou seja, se comparar-se o nível de fortificação de 7 p.p.m da Solução Amostra 4 com a (Tabela 5), (1 p.p.m – 10 p.p.m) que está entre (80% - 110%), a

recuperação obtida atende o critério de aceitação. E assim, sucessivamente para todas as concentrações descritas na (Tabela 18) e (Tabela 19).

**Tabela 18** – Resultados para Solução Amostra 4.

(Solução amostra 1 + Solução Amostra 3) = Solução Amostra 4					
Nível de fortificação (p.p.m)	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Nível de fortificação (p.p.m) calculado	Recuperação (%)
5 p.p.m Solução Amostra 1 + 2 p.p.m Solução Amostra 3 = 7 p.p.m	0,359	0,0005	0,149	6,988	98,975
7 p.p.m Solução Amostra 1 + 3 p.p.m Solução Amostra 3 = 10 p.p.m	0,511	0,003	0,522	10,031	101,186
9 p.p.m Solução Amostra 1 + 4 p.p.m Solução Amostra 3 = 13 p.p.m	0,660	0,007	0,104	12,990	99,463

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 19** – Resultados para Solução Amostra 5.

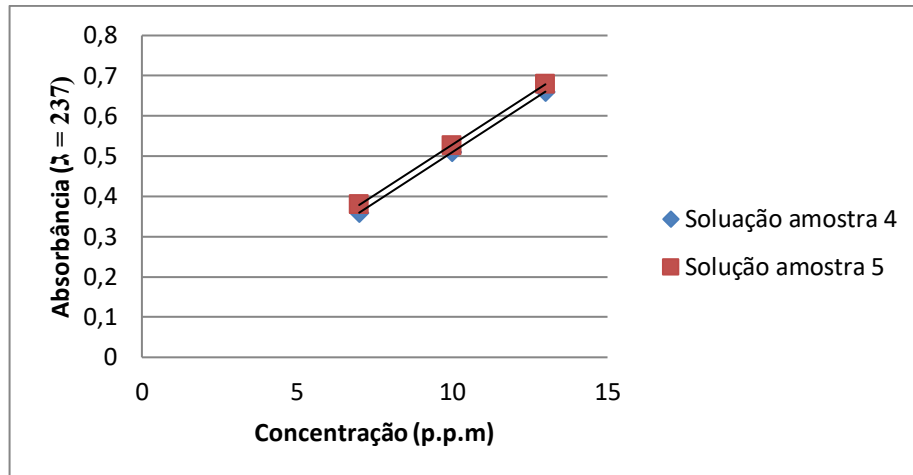
(Solução amostra 2 + Solução amostra 3) = Solução amostra 5					
Nível de fortificação (p.p.m)	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Nível de fortificação (p.p.m) calculado	Recuperação (%)
5 p.p.m Solução Amostra 2 + 2 p.p.m Solução Amostra 3 = 7 p.p.m	0,380	0,0005	0,152	7,030	102,461
7 p.p.m Solução Amostra 2 + 3 p.p.m Solução Amostra 3 = 10 p.p.m	0,526	0,002	0,304	9,944	96,987
9 p.p.m Solução Amostra 2 + 4 p.p.m Solução Amostra 3 = 13 p.p.m	0,680	0,001	0,132	13,017	101,275

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 20** – Equação da reta das Solução Amostra 4 e Solução Amostra 5.

Produto	Equação reta	$R^2$
Solução Amostra 4	$y = 0,05x + 0,0287$	0,9998
Solução Amostra 5	$y = 0,0502x + 0,0083$	1

**Fonte:** Autor, (2022)



**Figura 22** – Plotagem do gráfico Solução Amostra 4 e Solução Amostra 5.

**Fonte:** Autor, (2022)

Segundo os estudos de Validação de Metodologia Analítica desenvolvido por KUSTERS, *et al.* (2013), na “Determinação rápida, simples e indicadora de estabilidade de polihexametileno biguanida em dosagem líquida e gelatinosa por cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodos”, obteve %Recuperação para as concentrações de 0,02 mg/ mL á 0,06 mg/ mL (% Recuperação = 100,3% a 102,7%) para o PHMB. Se compararmos os dois estudos obteve-se no atual resultados satisfatórios.

Para a recuperação REGO (2017), definiu os critérios de aceitação de acordo com a necessidade da metodologia de 70% a 110%, obtando por não seguir o critério de aceitação sugerido pela ANVISA e INMETRO.

### 5.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção é a menor concentração de analito na amostra a ser detectada e o limite de quantificação é a menor concentração que pode ser quantificada.

Determinou-se a menor concentração para o atual método analítico, avaliando-se o limite de detecção e limite de quantificação do desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito. As leituras obtidas estão descritas na (Tabela 21), juntamente com a média, desvio padrão, limite de detecção e limite de quantificação. Realizou-se o cálculo do limite de detecção para o desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito através da Equação (13) e Equação (14), onde  $S_0$  representa o desvio padrão das leituras da concentração de 0,5 p.p.m, ou seja, é o menor valor de concentração aceito pelo método.

Para o desinfetante diluído obteve-se o limite de detecção de 0,0027 e o limite de quantificação 0,009 (Tabela 21), ou seja, o limite de detecção aceitável para esse método analítico é de 0,003 e o limite de quantificação aceitável 0,009.

Para o desinfetante concentrado obteve-se o limite de detecção de 0,002 e o limite de quantificação 0,007 (Tabela 21), ou seja, para a desinfetante concentrado o limite de detecção aceitável é de 0,002 e o limite de quantificação aceitável 0,007.

Para o analito obteve-se o limite de detecção de 0,002 e o limite de quantificação 0,006 (Tabela 21), ou seja, para o analito o limite de detecção aceitável é de 0,002 e o limite de quantificação aceitável é 0,006.

Os resultados de leitura das réplicas estão no APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES, para o desinfetante diluído (Tabela 38), desinfetante concentrado (Tabela 39) e analito (Tabela 40).

**Tabela 21** – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Solução analítica	Nível de fortificação (p.p.m)	Média (Absorbância $\lambda = 237$ )	Desvio Padrão	$LD = 3S_0$	$LQ = 10S_0$
Desinfetante diluído	0,5	0,008	0,001	0,003	0,009
Desinfetante concentrado	0,5	0,010	0,0007	0,002	0,007
Analito	0,5	0,012	0,0008	0,002	0,006

**Fonte:** (Autor, 2022).

## 6. CONCLUSÃO

Para o parâmetro seletividade, ficou evidenciado que para ambas as formulações (desinfetante concentrado e diluído) a existência de efeito da matriz na seletividade dos resultados analíticos do processo. Isso devido aos resultados obtidos, para a matriz desinfetante diluído *versus* analito, obteve-se  $F_{cal} > F_{tab}$  (variâncias estatisticamente diferentes) e  $t_{cal} > t_{tab}$  (médias estatisticamente diferentes). Para a matriz desinfetante concentrado *versus* analito, observou-se que para as concentrações de 2 p.p.m e 15 p.p.m o  $F_{cal} < F_{tab}$  (variâncias estatisticamente iguais), e para as demais concentrações  $F_{cal} > F_{tab}$  (variâncias estatisticamente diferentes); para todas as concentrações da matriz desinfetante concentrado o  $t_{cal} > t_{tab}$ , ou seja, estatisticamente as médias são diferentes.

A distribuição de dados para linearidade e faixa de trabalho do desinfetante concentrado e desinfetante diluído juntamente com o analito em estudo, se apresentaram homocedástico, com coeficiente linear ( $R^2 > 0,990$ ); para o desinfetante diluído  $R^2=1$ , para o desinfetante concentrado  $R^2= 0,993$  e para o analito  $R^2 =0,999$ , todos obtidos pelo método de regressão linear simples. Através do gráfico de dispersão de resíduos, observou-se a dispersão dos resultados, ou seja, os dados se apresentaram sem tendência. Sendo assim, o método de análise atendeu o parâmetro da linearidade.

O critério de avaliação da precisão foi avaliado a repetibilidade e precisão intermediária, para o estudo da repetibilidade definiu-se as mesmas condições de análise, ou seja, adotou-se a como parâmetro mesmo dia e mesmo analista. Realizou-se a avaliação através do Desvio Padrão Relativo obtidos com os critérios de aceitação sugeridos pelo INMETRO, baseados entre (11% -7,3%), para o desinfetante diluído para a concentração de 2 p.p.m o DPR% = 3,215; 5 p.p.m o DPR% = 1,312 e 10 p.p.m o DPR% = 0,741; para o desinfetante concentrado na concentração de 2 p.p.m o DPR% = 0,514; 5 p.p.m o DPR% = 0,306 e 10 p.p.m o DPR% = 1,311; para o analito 2 p.p.m o DPR% = 3,101; 5 p.p.m o DPR% = 0,375 e 10 p.p.m o DPR% = 0,342. Comparou-se os resultados obtidos *versus* critério de aceitação e conclui-se que todas as concentrações atenderam aos critérios. Para os a avaliação da precisão intermediária (diferentes condições de análise), optou-se por realizar as análises em dois dias diferentes e duas analistas diferentes, os resultados foram avaliados através do programa estatístico ANOVA, para o desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito observou ser o  $F > F_{crit}$  ; com o p-valor  $< 0,05$ , ou seja, as análises realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes não apresentaram diferença estatística em nenhum dos estudos. Sendo assim, a precisão do

método foi concluída.

Para exatidão do método, realizou-se testes de Recuperação% em diferentes níveis de concentrações para o desinfetante diluído e do desinfetante concentrado, e posteriormente comparou-se os resultados com os critérios de aceitação, sugeridos pelo INMETRO. Para o desinfetante diluído, chamou-se de Solução Amostra 1, o desinfetante concentrado chamou-se Solução Amostra 2 e o analito chamou-se Solução Amostra 3. Para verificação da concentração das soluções realizou-se as leituras em três diferentes concentrações para a Solução Amostra 1 (5 p.p.m; 7 p.p.m e 9 p.p.m), Solução Amostra 2 (5 p.p.m; 7 p.p.m e 9 p.p.m), e Solução Amostra 3 (2 p.p.m; 3 p.p.m e 4 p.p.m). Posteriormente, realizou-se as fortificações nas Solução de Amostra 4, representada pela adição da Solução de Amostra 1 + Solução de Amostra 3, obtendo-se para as concentrações finais de 7 p.p.m a %Recuperação = 98,975; 10 p.p.m a %Recuperação = 101,186; 13 p.p.m a %Recuperação = 99,463. Para a Solução de Amostra 5, representada pela adição de Solução de Amostra 2 + Solução de Amostra 3, obtendo-se para as concentrações finais de 7 p.p.m a %Recuperação = 102,461; 10 p.p.m a %Recuperação = 96,987; 13 p.p.m a %Recuperação = 101,275 . Quando comparados os resultados obtidos com os critérios de aceitação, entre 1 p.p.m (80%) e 100 p.p.m (107%), conclui-se que a %Recuperação para todas as concentrações foram satisfatórias.

Para o limite de detecção e limite de quantificação, conclui se que 0,5 p.p.m é a concentração para determinar o LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação) para ambas as formulações desinfetante diluído, desinfetante concentrado e o analito (PHMB). Para o desinfetante diluído obteve-se o resultado para o limite de detecção de 0,003 de absorbância e limite de quantificação de 0,009; para o desinfetante concentrado obteve-se o resultado para o limite de detecção de 0,002 de absorbância e limite de quantificação de 0,007 de absorbância; e para o analito obteve-se o resultado para o limite de detecção de 0,002 de absorbância e o limite de quantificação de 0,006 absorbância.

Após o estudo de Validação do Método Analítico, observou-se que o Quaternário de Amônio de 5º Geração, pode ser um possível interferente na leitura. Entretanto, para o presente trabalho os estudos foram conduzidos juntamente com o ativo PHMB, o que trouxe segurança para o método. Vale destacar outros possíveis interferentes como equipamentos sem calibração, treinamento dos analistas ou até mesmo a falta de padronização do método analítico. Para a Validação de um Método Analítico, deve-se atentar a detalhes analíticos específicos, como citados ao longo do texto.

Ao final do estudo de Validação do Método Analítico Espectrofotométrico UV/VIS, conclui-se que, o método atendeu todos os requisitos estatísticos de validação na verificação do teor do PHMB

para liberação dos produtos acabados para o mercado. Sendo assim, o método de análise garante a confiabilidade na quantificação do teor de ativo no produto acabado. Toda a documentação do processo de Validação do Método Analítico, fica disponível para a avaliação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e rastreabilidade do processo.



## REFERÊNCIAS

- Agência Europeia de Produtos Químicos. Regulation (EU) N°45 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. **Polyhexamethylene biguanide (Mn = 1600; PDI =1.8) (PHMB)**. França, 2015.
- BELOUAFI, S.; HABTI, F.; BENHAR, S.; BELAFKIH, B.; TAYANE, S.; HAMDOUCH, S.; BENNAMARA, A.; ABOURRICHE, A. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. **Int. J. Metrol. Qual. Eng.** 8,9 (2017).
- BRASIL**, Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies, 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BRASIL**, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 47 25 de outubro 2013. Boas Práticas de Fabricação para Produtos Saneantes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BRASIL**, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017, Boas Práticas às atividades de Validação de Métodos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BRASIL**, Instrução Normativa – IN n° 138, de 30 de março de 2022. Boas Práticas às atividades de Qualificação e Validação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BRASIL**, Instrução Normativa – RDC n° 700 de 13 de maio de 2022. Dispõe sobre a Ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semi críticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BUSSAB, W.O; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. 9 ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2017.
- COSTA, C.L.S. Validação de Métodos Ensaio. **Rede Metrológica de Minas Gerais**, 2022.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- EURACHEM**. Planning and Reporting Method Validation Studies. 1ª ed. 2019.
- FILHO, H. B.; *et. al.* **Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível**. Universidade de São Paulo, 2010.
- GERLIN, M.C.G. **Desenvolvimento e Validação de Método Analítico por CLAE para determinação simultânea de fármacos em formulações magistrais e estudo de compatibilidade entre componentes da fórmula**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Gande, 2021.
- Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**, 2016.
- Guidelines for Regulated Laboratories: Validation of Titration Methods. **Mettler Toledo Group**, 2012.
- ICH**. Harmonised Guideline Q2R2 Validation of analytical procedures, 2022.

**INMETRO.** Coordenação geral de acreditação. DOQ-CGRE-008: Orientações sobre método analítico. Rev.008. Abril, 2020.

MCPOLIN, O. **Validation Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis.** 2009.

KASVI. **Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções.** 2018. Disponível em: <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>

Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. **Amonium Compounds.** Vol. 2, 5ªEd, 2004.

KUSTERS, M.; BEYER, S. KUTSCHER. SCHLESINGER, H. GERHARTZ, M. Rapid, simple and stability-indication determination of polyhexamethylene biguanide in liquid and gel like dosage forms liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Pharmaceutical Analysis.** 2013. 408-414p.

McGEECHAN, P.L. Disinfectant and Sanitizer Formulation. **US 2012/0157540 A1.** Jun. 21.2012.

MELO, A. O. **Avaliação da toxicidade do cloridrato polihexametileno biguanida (PHMB) em *Biomphalaria glabrata*.** Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2018.

MOORE, L.E.; GILBERT, P. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology,** 2005, n°99, 703-715p.

**Norma brasileira:** ABNT NBR ISO 17025:2017.Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. 3 ed. Rio de Janeiro, 2017.

PEREZ, M. A. F. **Validação de Método Analítico: como fazer? Por que ela é importante?** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Vol. 22. N°3. Julho/Agosto/Setembro-2010.

**PIDAC.** Best Practices for Environmental Cleaning for Prevention and Control of Infections in All Health Care Settings. 3ª ed. Abril/2018.

SINDUSFARMA. **Guia Sindusfarma para Indústria Farmacéutica.** Vol. 17. 2016.

REGO, E. C. P. **Validação de Métodos.**1º Workshop de Laboratórios de Alimentação Animal. 2017.

RUTALA W.A.; WEBER, D.J. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. **Department of Health & Human Services.** USA ,2019.

Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (**VIM 2012**). Duque de Caxias, RJ : **INMETRO**, 2012.

VOGEL. **Análise Química Quantitativa.** 6ª Edição, LTC Editora, Rio de Janeiro-RJ, 2002.

SOUZA, M.G.A.; ROCHA, E.A.; MOREIRA, D.M.S.; CORRÊA, J.S. Fatores de interferência na qualidade da desinfecção e limpeza de superfícies hospitalar. **Brazilian Journal of Health Review,** Curitiba, v.4, n.2, p.8981-8993 mar./apr.2021.

## GLOSSÁRIO

**Analito:** substância química de interesse em uma amostra.

**Ativo:** moléculas da substância de interesse.

**Matriz:** conjunto de todos os constituintes que compõem uma amostra, sem analito.

**Método de adição padrão:** a adição de padrão analítico é uma alternativa ao método convencional muito empregada em análises por espectrometria de absorção ou de emissão atômica. Consiste na adição de quantidades conhecidas do padrão analítico em diferentes concentrações, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado.

**Produto comercial:** produto disponível no mercado, seguindo as adequações das legislações

**PHMB:** polihexametileno de biguanida, ativo de interesse.

**Solução de Amostra 1:** desinfetante diluído

**Solução de Amostra 2:** desinfetante concentrado

**Solução de Amostra 3 :** Analito.

**Solução de Amostra 4:** desinfetante diluído + analito.

**Solução de Amostra 5:**desinfetante concentrado + analito

## APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES.

**Tabela 22** – Resultados obtidos para matriz desinf. diluído *versus* analito, para seletividade.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
2	2 mL Matriz desinfetante diluído	0,0030	0,0030	0,0030	0,0010	0,0040	0,0030	0,0030
	2 mL Analito	0,0980	0,1050	0,1000	0,0980	0,1010	0,0990	0,0980
5	5 mL Matriz desinfetante diluído	0,0080	0,0140	0,0100	0,0150	0,0160	0,0140	0,0140
	5 mL Analito	0,2410	0,2520	0,2450	0,2550	0,2690	0,2560	0,2600
10	10 mL Matriz desinfetante diluído	0,0220	0,0230	0,0220	0,0230	0,0220	0,0220	0,0240
	10 mL Analito	0,5170	0,5250	0,5190	0,5200	0,5160	0,5150	0,5190
15	15 mL Matriz desinfetante diluído	0,0410	0,0400	0,0400	0,0410	0,0420	0,0450	0,0450
	15 mL Analito	0,7660	0,7860	0,7770	0,7900	0,8100	0,7760	0,7850
20	20 mL Matriz desinfetante diluído	0,0550	0,0530	0,0600	0,0550	0,0560	0,0550	0,0565
	20 mL Analito	1,0480	1,0450	1,0840	1,0770	1,0500	1,0550	1,0560

**Fonte:** Autor (2022)

**Tabela 23** – Resultados obtidos para matriz desinfetante concentrado *versus* analito, para seletividade.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
2	2 mL Matriz desinfetante concentrado	0,1740	0,1800	0,1855	0,1950	0,1860	0,1980	0,1850
	2 mL Analito	0,0980	0,1050	0,1000	0,0980	0,1010	0,0990	0,0800
5	5 mL Matriz desinfetante concentrado	0,4370	0,4430	0,4360	0,4440	0,4450	0,4360	0,4420
	5 mL Analito	0,2410	0,2520	0,2450	0,2550	0,2690	0,2560	0,2600
10	10 mL Matriz desinfetante concentrado	0,8250	0,8240	0,8260	0,8300	0,8250	0,8350	0,8300
	10 mL Analito	0,5170	0,5530	0,5190	0,5200	0,5160	0,5150	0,5190
15	15 mL Matriz desinfetante concentrado	1,2020	1,2150	1,2300	1,2200	1,2220	1,2190	1,2210
	15 mL Analito	0,7660	0,7860	0,7770	0,7900	0,8100	0,7760	0,7850
20	20 mL Matriz desinfetante concentrado	1,5700	1,6000	1,6100	1,5950	1,6000	1,6800	1,5670
	20 mL Analito	1,0480	1,0450	1,0840	1,0770	1,0500	1,0550	1,0560

**Fonte:** Autor (2022)

**Tabela 24**– Resultados das réplicas do desinfetante diluído para linearidade e faixa de trabalho.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal Instrumental das réplicas (Abs)		
		1	2	3
1	1 mL Desinfetante diluído	0,046	0,046	0,046
2	2 mL Desinfetante diluído	0,090	0,093	0,091
5	5 mL Desinfetante diluído	0,234	0,235	0,238
10	10 mL Desinfetante diluído	0,474	0,475	0,477
15	15 mL Desinfetante diluído	0,715	0,710	0,722
20	20 mL Desinfetante diluído	0,955	0,972	0,971

**Fonte:** Autor, (2022).

**Tabela 25** – Resultados das réplicas do desinfetante concentrado para linearidade e faixa de trabalho.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal Instrumental das réplicas (Abs)		
		1	2	3
1	1 mL Desinfetante concentrado	0,050	0,050	0,051
2	2 mL Desinfetante concentrado	0,100	0,101	0,104
5	5 mL Desinfetante concentrado	0,261	0,263	0,263
10	10 mL Desinfetante concentrado	0,504	0,490	0,511
15	15 mL Desinfetante concentrado	0,725	0,730	0,729
20	20 mL Desinfetante concentrado	1,010	0,990	0,995

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 26** – Resultados das réplicas do analito para linearidade: PHMB e faixa de trabalho.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal Instrumental das réplicas (Abs)		
		1	2	3
1	1 mL Analito	0,041	0,040	0,041
2	2 mL Analito	0,098	0,111	0,107
5	5 mL Analito	0,272	0,279	0,269
10	10 mL Analito	0,557	0,544	0,537
15	15 mL Analito	0,850	0,827	0,807
20	20 mL Analito	1,134	1,090	1,077

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 27** – Resultados para repetibilidade das análises do desinfetante diluído.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
		1	2	3	4	5	6
2	2 mL Desinfetante diluído	0,101	0,102	0,093	0,100	0,099	0,100
5	5 mL Desinfetante diluído	0,238	0,246	0,246	0,245	0,246	0,246
10	10 mL Desinfetante diluído	0,475	0,477	0,483	0,483	0,482	0,483

**Fonte:** Autor, (2022)

**Tabela 28** – Resultados para repetibilidade das análises do desinfetante concentrado .

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
		1	2	3	4	5	6
2	2 mL Desinfetante concentrado	0,107	0,106	0,106	0,107	0,106	0,107
5	5 mL Desinfetante concentrado	0,265	0,267	0,267	0,266	0,266	0,267
10	10 mL Desinfetante concentrado	0,510	0,526	0,527	0,527	0,527	0,527

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 29** – Resultados para repetibilidade das análises do analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
		1	2	3	4	5	6
2	2 mL Analito	0,111	0,119	0,121	0,119	0,120	0,120
5	5 mL Analito	0,290	0,292	0,293	0,293	0,292	0,292
10	10 mL Analito	0,570	0,572	0,575	0,575	0,574	0,574

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 30**– Resultados para precisão intermediária das análises do desinfetante diluído.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Dia	Analista	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
				1	2	3	4	5	6
2	2 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	1	0,101	0,102	0,093	0,100	0,099	0,100
5	5 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	1	0,238	0,246	0,246	0,245	0,246	0,246
10	10 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	1	0,475	0,477	0,483	0,483	0,482	0,483
2	2 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	2	0,099	0,098	0,100	0,101	0,101	0,105
5	5 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	2	0,240	0,241	0,245	0,245	0,241	0,242
10	10 mL Desinfetante diluído	Quarta feira	2	0,481	0,485	0,490	0,488	0,489	0,488
2	2 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	1	0,090	0,090	0,095	0,095	0,095	0,095
5	5 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	1	0,224	0,229	0,229	0,228	0,228	0,230
10	10 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	1	0,515	0,515	0,514	0,514	0,515	0,515
2	2 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	2	0,102	0,102	0,102	0,101	0,102	0,102
5	5 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	2	0,235	0,238	0,238	0,237	0,237	0,237
10	10 mL Desinfetante diluído	Quinta feira	2	0,490	0,499	0,499	0,499	0,499	0,499

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 31**– Resultados para precisão intermediária das análises para o desinf. concentrado.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Dia	Analista	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
				1	2	3	4	5	6
2	2 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	1	0,107	0,106	0,106	0,107	0,106	0,107
5	5 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	1	0,265	0,267	0,267	0,266	0,266	0,267
10	10 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	1	0,510	0,526	0,527	0,527	0,527	0,527
2	2 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	2	0,110	0,111	0,105	0,109	0,109	0,109
5	5 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	2	0,260	0,261	0,270	0,269	0,269	0,269
10	10 mL Desinfetante concentrado	Quarta feira	2	0,520	0,520	0,525	0,526	0,525	0,525
2	2 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	1	0,111	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110
5	5 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	1	0,271	0,272	0,275	0,271	0,271	0,272
10	10 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	1	0,520	0,525	0,521	0,521	0,522	0,521
2	2 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	2	0,106	0,106	0,106	0,106	0,105	0,106
5	5 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	2	0,255	0,256	0,255	0,257	0,255	0,255
10	10 mL Desinfetante concentrado	Quinta feira	2	0,532	0,535	0,531	0,531	0,531	0,531

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 32** – Resultados para precisão intermediária das análises do analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Dia	Analista	Sinal instrumental das réplicas (Abs)					
				1	2	3	4	5	6
2	2 mL Analito	Quarta feira	1	0,111	0,119	0,121	0,119	0,120	0,120
5	5 mL Analito	Quarta feira	1	0,290	0,292	0,293	0,293	0,292	0,292
10	10 mL Analito	Quarta feira	1	0,570	0,572	0,575	0,575	0,574	0,574
2	2 mL Analito	Quarta feira	2	0,115	0,116	0,115	0,116	0,115	0,115
5	5 mL Analito	Quarta feira	2	0,281	0,285	0,290	0,288	0,289	0,290
10	10 mL Analito	Quarta feira	2	0,575	0,575	0,569	0,569	0,570	0,570
2	2 mL Analito	Quinta feira	1	0,111	0,110	0,110	0,110	0,112	0,110
5	5 mL Analito	Quinta feira	1	0,295	0,296	0,296	0,296	0,295	0,295
10	10 mL Analito	Quinta feira	1	0,565	0,565	0,566	0,566	0,566	0,565
2	2 mL Analito	Quinta feira	2	0,110	0,111	0,111	0,112	0,111	0,111
5	5 mL Analito	Quinta feira	2	0,289	0,289	0,289	0,289	0,290	0,290
10	10 mL Analito	Quinta feira	2	0,569	0,565	0,566	0,566	0,566	0,569

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 33** – Resultados para recuperação da Solução Amostra 1: desinfetante diluído.

Nível de fortificação (p.p.m) teórico	Solução Amostra 1	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
5	5 mL Desinfetante diluído	0,250	0,251	0,250	0,251	0,251	0,252	0,251
7	7 mL Desinfetante diluído	0,343	0,343	0,340	0,343	0,344	0,343	0,343
9	9 mL Desinfetante diluído	0,439	0,440	0,441	0,441	0,440	0,440	0,440

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 34**– Resultados para recuperação da Solução Amostra 2: desinfetante concentrado.

Nível de fortificação (p.p.m) teórico	Solução Amostra 2	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
5	5 mL Desinfetante concentrado	0,274	0,275	0,275	0,275	0,274	0,275	0,275
7	7 mL Desinfetante concentrado	0,372	0,380	0,379	0,379	0,380	0,380	0,380
9	9 mL Desinfetante concentrado	0,475	0,481	0,481	0,481	0,480	0,481	0,481

**Fonte:** Autor, (2022).

**Tabela 35** – Resultados para recuperação da Solução Amostra 3: analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução Amostra 3	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
2	2 mL Analito	0,121	0,120	0,120	0,120	0,121	0,121	0,120
3	3 mL Analito	0,180	0,180	0,181	0,181	0,181	0,181	0,180
4	4 mL Analito	0,236	0,236	0,236	0,235	0,235	0,236	0,236

**Fonte:** Autor, (2022).

**Tabela 36**– Resultados para Recuperação da Solução Amostra 4 = Solução Amostra 1 (desinfetante diluído) + Solução Amostra 3 (analito)

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução amostra 4	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
7	5 mL Solução Amostra 1 + 2 mL Solução Amostra 3	0,359	0,359	0,359	0,360	0,359	0,360	0,360
10	7 mL Solução Amostra 1 + 3 mL Solução Amostra 3	0,508	0,517	0,511	0,512	0,512	0,512	0,511
13	9 mL Solução Amostra 1 + 4 mL Solução Amostra 3	0,659	0,661	0,660	0,661	0,660	0,660	0,660

**Fonte:** Autor, (2022).

**Tabela 37**– Resultados para Recuperação da Solução Amostra 5 = Solução Amostra 2 (desinfetante concentrado) + Solução Amostra 3 (analito).

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução amostra 4	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
7	5 mL Solução Amostra 2 + 2 mL Solução Amostra 3	0,379	0,380	0,380	0,380	0,381	0,380	0,380
10	7 mL Solução Amostra 2 + 3 mL Solução Amostra 3	0,530	0,525	0,526	0,526	0,526	0,527	0,527
13	9 mL Solução Amostra 2 + 4 mL Solução Amostra 3	0,681	0,681	0,682	0,682	0,680	0,680	0,680

**Fonte:** Autor, (2022).



**Tabela 38** – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação das réplicas da matriz desinfetante diluído fortificados com analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
0,5	0,5 mL Matriz desinf. diluído + 0,5 mL (analito)	0,008	0,010	0,010	0,009	0,008	0,008	0,009

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 39** – Resultados para Limite de Detecção e Limite de Quantificação das réplicas da matriz desinfetante concentrado fortificados com analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
0,5	0,5 mL Matriz desinf. conc. + 0,5 mL (analito)	0,012	0,011	0,010	0,011	0,011	0,010	0,011

Fonte: Autor, (2022)

**Tabela 40** – Resultados para Limite de Detecção de Limite de Quantificação das réplicas do analito.

Nível de fortificação (p.p.m)	Solução analítica	Sinal instrumental das réplicas (Abs)						
		1	2	3	4	5	6	7
0,5	0,5 mL (analito)	0,013	0,013	0,011	0,012	0,012	0,012	0,011

Fonte: Autor, (2022)

## APÊNDICE B – CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES

### Analito

**Analito:** solução aquosa com 20% de ativo (PHMB).

$(0,5 \text{ g}) * 20\% = 0,1 \text{ g de ativo} / 1000 \text{ mL} = 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  ou 1 g/L ou 100 p.p.m

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0,5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \text{ ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$2 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 2 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \text{ ou } 2 \times 10^{-3} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{2 \text{ p.p.m}}$$

$$5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \text{ ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$10 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL} \text{ ou } 1 \times 10^{-2} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{10 \text{ p.p.m}}$$

$$15 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 15 \times 10^{-5} \text{ g/mL} \text{ ou } 1,5 \times 10^{-2} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{15 \text{ p.p.m}}$$

$$20 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 2 \times 10^{-5} \text{ g/mL} \text{ ou } 2 \times 10^{-2} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{20 \text{ p.p.m}}$$

### Desinfetante diluído

Total do ativo (PHMB) na formulação do desinfetante diluído = 0,075%.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

0,5 g do analito \* 20% do ativo = x \* 0,075% de ativo na formulação final

$$x = 133,333 \text{ g do desinfetante diluído}$$

$133,333 \text{ g} * 0,075\% = 0,1 \text{ g do ativo na formulação} / 1000 \text{ mL} = 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$

ou 1 g/L ou 100 p.p.m

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0,5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \text{ ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$2 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = x * 100 \text{ mL}$$

$$x = 2 \times 10^{-6} \text{ g/mL} \text{ ou } 2 \times 10^{-3} \text{ g/L} \text{ ou } \mathbf{2 \text{ p.p.m}}$$

$$5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$10 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 1 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{10 \text{ p.p.m}}$$

$$15 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 15 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 1,5 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{15 \text{ p.p.m}}$$

$$20 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 2 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 2 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{20 \text{ p.p.m}}$$

### Desinfetante concentrado

Total do ativo (PHMB) na formulação do desinfetante concentrado = 3,0 %.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

0,5 g do analito \* 20% do ativo = x \* 3% de ativo na formulação final

$$\mathbf{x = 3,333 \text{ g do desinfetante concentrado}}$$

3,333 g \* 3% = 0,1 g do ativo na formulação / 1000 mL =  $1 \times 10^{-4}$  g/mL **ou** 1 g/L **ou** 100 p.p.m

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0,5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$2 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 2 \times 10^{-6} \text{ g/mL ou } 2 \times 10^{-3} \text{ g/L ou } \mathbf{2 \text{ p.p.m}}$$

$$5 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 5 \times 10^{-6} \text{ g/mL ou } 5 \times 10^{-3} \text{ g/L ou } \mathbf{5 \text{ p.p.m}}$$

$$10 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 1 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{10 \text{ p.p.m}}$$


$$15 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 15 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 1,5 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{15 \text{ p.p.m}}$$

$$20 \text{ mL} * 1 \times 10^{-4} \text{ g/mL} = \mathbf{x} * 100 \text{ mL}$$

$$\mathbf{x} = 2 \times 10^{-5} \text{ g/mL ou } 2 \times 10^{-2} \text{ g/L ou } \mathbf{20 \text{ p.p.m}}$$

## ANEXO A – LAUDO DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

		<b>Certificado de Calibração</b> <b>Laboratório Medição Uberlândia</b>				
Certificado: 101678/22	Data Calibração: 20/04/2022	Validade: 04/2023	OS: 749219-C/2022			
Solicitante:		1 / 3				
Local do serviço:						
Contratante:						
<b>Características do Instrumento</b>						
Descrição: ESPECTROFOTÔMETRO	Modelo: UV-M51	Identificação: EQUIP.LFQ.31	Setor: LABORATORIO FISICO-Q			
Marca: BEL						
<b>Condições Ambientais</b>						
Serviço executado nas instalações do solicitante.						
Temperatura: 23.7 °C ± 1.0 °C	Umidade: 48.0 %ur ± 5.0 %ur					
<b>Procedimentos</b>						
Calibração Executada conforme:	ITTEC229	Revisão: 0				
<b>Padrões</b>						
Identificação: PTO-1163	PADRÃO DE ESPECTROFOTOMETRIA	Marca: HELIMA	Certificado: LV02873-44367-21-R0			
			Calibrado por: VISOMES-CAL0127			
			Validade: 12/2025			
<b>Resultados Obtidos</b>						
<b>1.1 ABS 440nm</b>						
Faixa de Uso:	0,000 a 3,000	Abs				
Faixa de Indicação:	0,000 a 3,000	Abs	Resolução: 0,001 Abs			
V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	( k )	Veff
Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
0.272	0.269	-0.003	0.004	0.007	2,00	Infinito
0.530	0.524	-0.006	0.004	0.010	2,00	Infinito
1.059	1.049	-0.010	0.005	0.015	2,00	Infinito
<b>1.2 ABS 465nm</b>						
Faixa de Uso:	0,000 a 3,000	Abs				
Faixa de Indicação:	0,000 a 3,000	Abs	Resolução: 0,001 Abs			
V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	( k )	Veff
Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
0.244	0.243	-0.001	0.004	0.005	2,00	Infinito
0.488	0.484	-0.004	0.004	0.008	2,00	Infinito
0.982	0.976	-0.006	0.005	0.011	2,00	Infinito



## Certificado de Calibração Laboratório Medição Uberlândia

**Certificado:** 101678/22

**Data Calibração:** 20/04/2022

**Validade:** 04/2023

**OS:** 749219-C/2022

2 / 3

**1.3 ABS 490nm**

Faixa de Uso: 0,000 a 3,000 Abs

Faixa de Indicação: 0,000 a 3,000 Abs Resolução: 0,001 Abs

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
0,293	0,292	-0,001	0,004	0,005	2,00	Infinito
0,566	0,561	-0,005	0,004	0,009	2,00	Infinito
1,062	1,053	-0,009	0,005	0,014	2,00	Infinito

**1.4 ABS 635nm**

Faixa de Uso: 0,000 a 3,000 Abs

Faixa de Indicação: 0,000 a 3,000 Abs Resolução: 0,001 Abs

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
0,294	0,293	-0,001	0,004	0,005	2,00	Infinito
0,561	0,557	-0,004	0,004	0,008	2,00	Infinito
1,022	1,016	-0,006	0,005	0,011	2,00	Infinito

**1.5 TRANS 440nm**

Faixa de Uso: 0,0 a 100,0 %T

Faixa de Indicação: 0,0 a 100,0 %T Resolução: 0,1 %T

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
%T	%T	%T	%T	%T		
8,7	8,9	0,1	0,1	0,2	2,00	Infinito
29,5	29,8	0,3	0,2	0,5	2,00	Infinito
53,5	53,7	0,2	0,4	0,6	2,00	Infinito

**1.6 TRANS 465nm**

Faixa de Uso: 0,0 a 100,0 %T

Faixa de Indicação: 0,0 a 100,0 %T Resolução: 0,1 %T

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
%T	%T	%T	%T	%T		
10,4	10,6	0,2	0,1	0,3	2,00	Infinito
32,5	32,9	0,4	0,2	0,6	2,00	Infinito
57,1	57,2	0,1	0,4	0,5	2,00	Infinito



## Certificado de Calibração Laboratório Medição Uberlândia

**Certificado:** 101678/22

**Data Calibração:** 20/04/2022

**Validade:** 04/2023

**OS:** 749219-C/2022

3 / 3

**1.7 TRANS 590nm**

Faixa de Uso: 0,0 a 100,0 %T

Faixa de Indicação: 0,0 a 100,0 %T      Resolução: 0,1 %T

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
%T	%T	%T	%T	%T		
8,7	8,9	0,2	0,1	0,3	2,00	Infinito
27,2	27,5	0,3	0,2	0,5	2,00	Infinito
50,9	51,2	0,3	0,4	0,7	2,00	Infinito

**1.8 TRANS 635nm**

Faixa de Uso: 0,0 a 100,0 %T

Faixa de Indicação: 0,0 a 100,0 %T      Resolução: 0,1 %T

V.R	V.I	Erro de Medição	Incerteza Expandida	Incerteza Expandida + Erro	(k)	Veff
%T	%T	%T	%T	%T		
9,5	9,7	0,2	0,1	0,3	2,00	Infinito
27,5	27,9	0,4	0,2	0,6	2,00	Infinito
50,9	51,3	0,4	0,4	0,8	2,00	Infinito

**Observações Gerais**

NÃO HOUVE AJUSTE

- V.R: Valor de Referência na unidade de medição do padrão.
- V.I: Valor médio indicado no instrumento na unidade de medição do mesmo.
- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão de medição multiplicada pelo fator de abrangência k, o qual para uma distribuição t com Veff graus de liberdade efetivos corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%.
- A incerteza padrão da medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.
- A condição de Aprovado/Reprovado se restringe apenas as grandezas metroológicas do instrumento, sendo que o limite de erro especificado para esta condição é de responsabilidade do Cliente.
- A operação de ajuste / regulagem não faz parte do escopo dos serviços.
- A validade de calibração do instrumento, quando apresentada neste certificado, é de responsabilidade do cliente.

 Endereço de Emissão: Rua Nicariagua, 1390 - Bairro: Tibery - Uberlândia - Minas Gerais  
 Data de emissão: 02 de Maio de 2022


Gerente Técnico

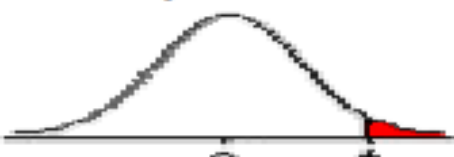
## ANEXO B – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F-SNEDECOR

v2		Distribuição F de Snedecor																	
		v1 = graus de liberdade do numerador																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120
0.100	39,86	49,50	53,59	55,83	57,24	58,20	58,91	59,44	59,86	60,19	60,71	61,22	61,74	62,00	62,26	62,53	62,79	63,06	
0.050	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,68	240,54	241,88	243,90	245,95	248,02	249,05	250,10	251,14	252,20	253,25	
0.025	647,79	799,48	864,15	896,60	921,83	940,20	956,60	971,11	984,20	996,64	1008,68	1020,72	1032,76	1044,80	1056,84	1068,88	1080,92	1092,96	1105,00
0.010	4052,18	4899,34	5403,53	5624,26	5783,96	5858,95	5928,33	5980,95	6022,40	6055,93	6108,68	6156,97	6208,66	6234,27	6280,35	6312,97	6339,51		
0.100	8,53	9,00	9,16	9,24	9,29	9,33	9,35	9,37	9,38	9,39	9,41	9,42	9,44	9,45	9,46	9,47	9,47	9,48	
0.050	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	
0.025	38,51	39,00	39,17	39,25	39,30	39,33	39,36	39,37	39,39	39,40	39,41	39,43	39,45	39,46	39,46	39,47	39,48	39,49	
0.010	98,50	99,00	99,16	99,25	99,30	99,33	99,36	99,38	99,39	99,40	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,48	99,48	99,49	
0.100	5,64	5,46	5,39	5,34	5,31	5,28	5,27	5,25	5,24	5,23	5,22	5,20	5,18	5,17	5,16	5,15	5,14		
0.050	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	
0.025	17,44	16,04	15,44	15,10	14,68	14,73	14,62	14,54	14,47	14,42	14,34	14,25	14,17	14,12	14,08	14,04	13,99	13,95	
0.010	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23	27,05	26,87	26,69	26,60	26,50	26,41	26,32	26,22	
0.100	4,54	4,32	4,19	4,11	4,05	4,01	3,98	3,95	3,94	3,92	3,90	3,87	3,84	3,83	3,82	3,80	3,79	3,78	
0.050	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	
0.025	12,22	10,85	9,98	9,60	9,36	9,20	9,07	8,98	8,90	8,84	8,75	8,66	8,56	8,51	8,46	8,41	8,36	8,31	
0.010	21,20	18,00	16,89	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,37	14,20	14,02	13,93	13,84	13,75	13,65	13,56	
0.100	4,06	3,78	3,62	3,52	3,45	3,40	3,37	3,34	3,32	3,30	3,27	3,24	3,21	3,19	3,17	3,16	3,14	3,12	
0.050	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	
0.025	10,01	8,43	7,76	7,39	7,15	6,98	6,85	6,76	6,68	6,62	6,52	6,43	6,33	6,23	6,18	6,12	6,07	6,02	
0.010	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,89	9,72	9,55	9,47	9,38	9,29	9,20	9,11	
0.100	3,76	3,46	3,29	3,18	3,11	3,05	3,01	2,98	2,96	2,94	2,90	2,87	2,84	2,82	2,80	2,78	2,76	2,74	
0.050	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	
0.025	8,81	7,26	6,60	6,23	5,99	5,82	5,70	5,60	5,52	5,46	5,37	5,27	5,17	5,12	5,07	5,01	4,96	4,90	
0.010	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,72	7,56	7,40	7,31	7,23	7,14	7,06	6,97	
0.100	3,59	3,26	3,07	2,96	2,89	2,83	2,78	2,75	2,72	2,70	2,67	2,63	2,59	2,58	2,56	2,54	2,51	2,49	
0.050	5,69	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	
0.025	8,07	6,54	5,89	5,52	5,29	5,12	4,99	4,90	4,82	4,76	4,67	4,57	4,47	4,41	4,36	4,31	4,25	4,20	
0.010	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,47	6,31	6,16	6,07	5,99	5,91	5,82	5,74	
0.100	3,46	3,11	2,92	2,81	2,73	2,67	2,62	2,59	2,56	2,54	2,50	2,46	2,42	2,40	2,38	2,34	2,32	2,30	
0.050	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,43	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	
0.025	7,67	6,06	5,42	5,05	4,82	4,65	4,53	4,43	4,36	4,30	4,20	4,10	4,00	3,95	3,89	3,84	3,78	3,73	
0.010	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,67	5,52	5,36	5,28	5,20	5,12	5,03	4,95	
0.100	3,36	3,01	2,81	2,69	2,61	2,55	2,51	2,47	2,44	2,42	2,38	2,34	2,30	2,28	2,25	2,23	2,21	2,18	
0.050	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	
0.025	7,21	5,71	5,08	4,72	4,48	4,32	4,20	4,10	4,03	3,96	3,87	3,77	3,67	3,61	3,56	3,51	3,45	3,39	
0.010	10,58	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,11	4,96	4,81	4,73	4,65	4,57	4,48	4,40	
0.100	3,29	2,92	2,73	2,61	2,52	2,46	2,41	2,38	2,35	2,32	2,28	2,24	2,20	2,18	2,16	2,13	2,11	2,08	
0.050	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	
0.025	6,94	5,46	4,83	4,47	4,24	4,08	3,95	3,85	3,78	3,72	3,62	3,52	3,42	3,37	3,31	3,26	3,20	3,14	
0.010	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,71	4,56	4,41	4,33	4,25	4,17	4,08	4,00	
0.100	3,23	2,86	2,66	2,54	2,45	2,39	2,34	2,30	2,27	2,25	2,21	2,17	2,12	2,10	2,08	2,05	2,03	2,00	
0.050	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	
0.025	6,72	5,26	4,63	4,28	4,04	3,88	3,76	3,68	3,59	3,53	3,43	3,33	3,23	3,17	3,12	3,06	3,00	2,94	
0.010	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54	4,40	4,25	4,10	4,02	3,94	3,86	3,78	3,69	
0.100	3,18	2,81	2,61	2,48	2,39	2,33	2,28	2,24	2,21	2,19	2,15	2,10	2,06	2,04	2,01	1,99	1,96	1,93	
0.050	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	
0.025	6,55	5,10	4,47	4,12	3,89	3,73	3,61	3,51	3,44	3,37	3,28	3,18	3,07	3,02	2,96	2,91	2,85	2,79	
0.010	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,16	4,01	3,86	3,78	3,70	3,62	3,54	3,45	
0.100	3,14	2,76	2,56	2,43	2,35	2,28	2,23	2,20	2,16	2,14	2,10	2,05	2,01	1,98	1,96	1,93	1,90	1,88	
0.050	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	
0.025	6,41	4,97	4,35	4,00	3,77	3,60	3,48	3,39	3,31	3,25	3,15	3,05	2,95	2,89	2,84	2,78	2,72	2,66	
0.010	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	3,96	3,82	3,66	3,59	3,51	3,43	3,34	3,25	
0.100	3,10	2,73	2,52	2,39	2,31	2,24	2,19	2,15	2,12	2,10	2,05	2,01	1,96	1,94	1,91	1,89	1,86	1,83	
0.050	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	
0.025	6,30	4,86	4,24	3,89	3,66	3,50	3,38	3,29	3,21	3,15	3,05	2,95	2,84	2,79	2,73	2,67	2,61	2,55	
0.010	8,98	6,61	5,66	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,80	3,66	3,51	3,43	3,35	3,27	3,18	3,09	



## ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO t-Student

**Distribuição t de Student**



gl	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,0083	0,005
1	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	38,343	63,656
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	7,664	9,925
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	4,864	5,841
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	3,966	4,604
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	3,538	4,032
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,291	3,707
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,130	3,499
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,018	3,355
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	2,936	3,250
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	2,872	3,169
11	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	2,822	3,106
12	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	2,782	3,055
13	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	2,748	3,012
14	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,720	2,977
15	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,696	2,947
16	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,675	2,921
17	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,657	2,898
18	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,641	2,878
19	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,627	2,861
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,614	2,845
21	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,603	2,831
22	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,593	2,819
23	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,584	2,807
24	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,575	2,797
25	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,568	2,787
26	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,561	2,779
27	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,554	2,771
28	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,548	2,763
29	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,543	2,756
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,537	2,750
35	0,682	1,306	1,690	2,030	2,438	2,516	2,724
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,501	2,704
45	0,680	1,301	1,679	2,014	2,412	2,488	2,690
50	0,679	1,299	1,676	2,009	2,403	2,479	2,678
60	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,465	2,660
70	0,678	1,294	1,667	1,994	2,381	2,454	2,648
80	0,678	1,292	1,664	1,990	2,374	2,447	2,639
90	0,677	1,291	1,662	1,987	2,368	2,441	2,632
100	0,677	1,290	1,660	1,984	2,364	2,436	2,626
110	0,677	1,289	1,659	1,982	2,361	2,433	2,621
120	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,430	2,617
130	0,676	1,288	1,657	1,978	2,355	2,427	2,614