

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTÉFANO ROBERTO VIEIRA

Controle da matéria-prima, sacarina com relação à presença de orto-  
toluenosulfonamida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTÉFANO ROBERTO VIEIRA

Controle da matéria-prima, sacarina com relação à presença de orto-toluenosulfonamida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção de grau de bacharel em Química Industrial.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Tânia Mara Pizzolato  
Orientadora

Msc. Renato Cesar Susin (CIENTEC)  
Supervisor

Porto Alegre, 2014

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1. Revisão bibliográfica.....	11
2. Objetivo .....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivo Específico.....	15
3. Introdução.....	16
4. Metodologia .....	17
4.1 Controle de Qualidade.....	17
4.2 Materiais e Métodos .....	17
4.3 Preparo das Soluções .....	18
4.4 Preparo das amostras .....	18
4.4.1 Preparo de amostra de trabalho .....	18
4.4.2 Preparo de amostra fortificada.....	18
4.5 Validação da metodologia .....	18
4.5.1 Seletividade.....	19
4.5.2 Linearidade e faixa de aplicação.....	19
4.5.3 Precisão .....	19
4.5.4 Exatidão .....	20
4.5.5 Limite de Detecção.....	20
4.5.6 Limite de Quantificação .....	21
4.5.7 Robustez .....	21
4.6 Análise Instrumental .....	22
5. Resultados e discussão .....	23
5.1 Seletividade.....	23
5.2 Linearidade.....	25
5.3 Faixa de trabalho.....	26
5.4 Precisão .....	26
5.4.1 Reprodutibilidade .....	26
5.4.2 Precisão Intermediária e Repetitividade .....	27
5.5 Limite de Quantificação .....	28
5.6 Limite de Detecção.....	28
5.7 Robustez.....	29
6. Amostra comercial e Pureza.....	30
7. Precificação.....	31

8. Conclusões.....	32
9. Referências bibliográficas.....	33

À minha família e às pessoas que acreditam na verdadeira ciência.

*“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível  
Que o céu é o limite e você,[...], é imbatível  
Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase  
E o sofrimento alimenta mais a sua coragem  
[...]  
A única verdade universal que mantém a fé  
Olhem as crianças que são o futuro e a esperança”*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros de validação sugeridos pelo Inmetro .....	13
Tabela 2 - Reagentes usados no ensaio .....	17
Tabela 3 – Equipamentos e instrumentos volumétricos.....	17
Tabela 4 - Volume de solução estoque de orto-toluenosulfonamida utilizada e concentração final em cada nível .....	18
Tabela 5 - Concentração de Orto-Toluenosulfonamida adicionada à soluções de amostra de trabalho .....	18
Tabela 6 - Condições de análise por cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de UV-Vis.....	22
Tabela 7 - Tempos de retenção para a adição de 0,5 mg L <sup>-1</sup> de Orto-Toluenosulfonamida em matriz sacarina.....	23
Tabela 8 - Tempos de retenção para padrão de 0,5 mg L <sup>-1</sup> de Orto-Toluenosulfonamida ...	23
Tabela 9 - Resultados dos cálculos de resolução e variação de tempo de retenção para a matriz.....	24
Tabela 10 - Valores de recuperações de orto-toluenosulfonamida em sacarina.....	24
Tabela 11- Resultado do teste de Grubbs para a matriz sacarina nos maiores e menores valores das replicatas em cada nível de concentração.....	24
Tabela 12 - Áreas das três injeções de cada nível de concentração da curva analítica. ....	25
Tabela 13 - Valores de coeficiente angular, coeficiente linear e correlação linear quadrática da curva analítica. ....	26
Tabela 14 - Valores de Horrat para Orto-Toluenosulfonamida utilizando a razão de concentração de 10 <sup>-6</sup> referente à magnitude da escala utilizada (mg L <sup>-1</sup> ).....	27
Tabela 15 – Ensaio de precisão intermediária utilizando condição 1 (Operador 1/ Preparador de amostra 1) .....	27
Tabela 16 – Ensaio de precisão intermediária utilizando condição 2 (Operador 2/ Preparador de amostra 2) .....	28
Tabela 17 - Resultados limite de quantificação para Orto-Toluenosulfonamida.....	28
Tabela 18 - Resultado da injeção mais diluída.....	29
Tabela 19 – Teste de Youden, parâmetros variados para estudo de robustez.....	29
Tabela 20- Resultados do Teste de Youden em varrições de tempo de retenção e área com variação de parâmetros de A-G .....	30
Tabela 21 - Ensaio de Orto-Toluenosulfonamida em sacarina (realizado com uma diluição de 10 vezes) .....	30
Tabela 22 - Ensaio de Orto-Toluenosulfonamida comercial (realizado com uma diluição de 20 vezes) .....	30
Tabela 23 – Precificação para instalação.....	31
Tabela 24 - Precificação da rotina .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de cromatografia líquida de alta eficiência.....	12
Figura 2 - Orto- toluenosulfonamida.....	13
Figura 3 – Esquema representando a síntese de orto-toluenosulfonamida, de acordo com Ager et al. 1998.....	14
Figura 4 - Cromatograma de amostra de sacarina com adição de Orto-Toluenosulfonamida na concentração de 0,5 mg L <sup>-1</sup> .....	23
Figura 5 - Gráfico da curva analítica do Orto-Toluenosulfonamida.....	25
Figura 6 - Gráfico de resíduos.....	26



## LISTA DE ABREVIATURAS

**OTSA** – Orto-tolueno sulfonamida

**CIENTEC** – Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

**HPLC** – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

**INMETRO** - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

**UV-VIS** – Detector na região do ultravioleta - visível

**LD** – Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**OEHHA** – do inglês *Office of Environmental Health Hazard Assessment*

**DPR** – Desvio Padrão Relativo

**Rt** – Tempo de Retenção

## RESUMO

A sacarina é um edulcorante com uso bem difundido oriundo da orto-toluenosulfonamida (OTSA), e a presença do seu precursor, no produto comercial, é um parâmetro determinante na qualidade deste adoçante. Visando estabelecer um eficiente controle de qualidade industrial das empresas produtoras de sacarina, nesse trabalho, foi proposta metodologia analítica para a determinação de orto-toluenosulfonamida, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta. O trabalho foi desenvolvido na Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (CIENTEC), durante o estágio de formação acadêmica.

A fim de determinar a viabilidade de utilização de um método de controle, inicialmente é necessário estabelecer os parâmetros de validação do mesmo. Entende-se por validação o estudo de linearidade da região que contempla a curva analítica, juntamente com a demonstração do gráfico de resíduos; a determinação do limite de quantificação (LQ) e do limite de detecção (LD); estudos de seletividade e parâmetros como linearidade, tendência e precisão. Ensaios de repetitividade e reprodutibilidade foram realizados e contaram com auxílio de outros analistas e a robustez do método evidenciando a influência das variações de parâmetros analíticos nos resultados finais. Todos os dados obtidos foram estatisticamente avaliados.

Os resultados foram interpretados usando planilha eletrônica desenvolvida exclusivamente para validações de metodologias cromatográficas. Com os devidos parâmetros analisados a confiabilidade da metodologia é assegurada para a implementação desse ensaio para com o fim de estabelecer o controle de qualidade de uma empresa produtora de sacarina.

Fatores financeiros foram analisados e o uso rotineiro dessa metodologia gera um custo de R\$ 105,60 por turno trabalhado. A implementação de um laboratório ira necessitar um investimento de **R\$ 228.677,00** viabilizando a instalação do ensaio na sistemática de controle qualidade do produto.

**Palavras-chave:** sacarina, edulcorante, orto-toluenosulfonamida, Validação de método, cromatografia líquida.

## 1. Revisão bibliográfica

### 1.1. Métodos cromatográficos de análise

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre, geralmente, devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a *fase móvel* e a *fase estacionária*. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI, 1998)

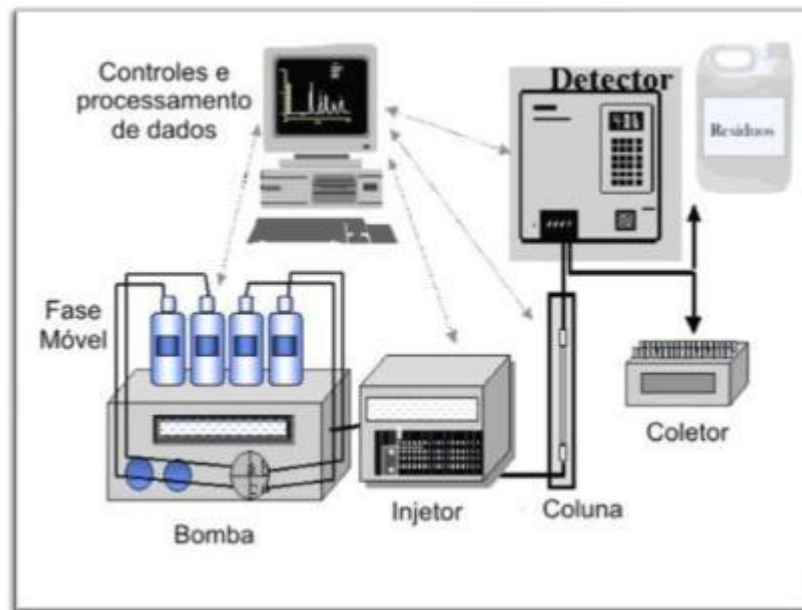
Por definição, dois tipos de fases estacionárias existem nas técnicas cromatográficas. Uma denominada “planar” que utiliza uma superfície plana suportada com alguma espécie química para realizar a separação e “em coluna” onde tubos cilíndricos empacotados ou não com alguma espécie química habilitada para realizar a separação cromatográfica.

As fases móveis utilizadas em cromatografia definem as características e as estratégias a serem usadas para quantificar uma gama de analitos. Utilizam-se fases móveis líquidas ou gasosas distinguindo instrumentalmente as técnicas de cromatografia à líquido (HPLC) e a cromatografia à gás (GC) (SKOOG et al., 2006, p. 924).

O uso de detectores de propriedades químicas é de extrema importância para transformar informações físicas em sinais elétricos e assim proporcionar a habilidade de identificar e quantificar estas espécies. Para a cromatografia à líquido os principais detectores são de absorção na região de ultravioleta-visível, de fluorescência, evaporativo de espalhamento de luz, de índice de refração, etc (COLLINS et al., 1993).

A Figura 1 mostra um esquema relacionando as etapas de processamento de uma análise de cromatografia à líquido, evidenciando a fase móvel usada, a bomba que faz o fluxo ser constante, o injetor onde as amostras são inseridas no sistema, a coluna cromatográfica onde é realizada a separação e o detector que identifica as informações. Um sistema de processamento de dados é usado e os rejeitos tratados da maneira ambientalmente mais correta.

Figura 1 - Esquema de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.



## 1.2. Validação de metodologias analíticas

A necessidade de evidenciar a eficiência de medições em ensaios analíticos é de fundamental importância e está cada vez mais sendo exigido para o reconhecimento da eficácia do ensaio. Características de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade são requisitos indispensáveis para o credenciamento e a garantia de confiabilidade dos ensaios. (ISO/EC 17025, 1999).

“A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.” (RIBANI et al., 2004)

Diversas estratégias podem ser utilizadas em uma validação metodológica, onde pequenas alterações dos parâmetros validados se diferem.

A Tabela 1 mostra os parâmetros de validação sugeridos pelo INMETRO no documento orientativo INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011).

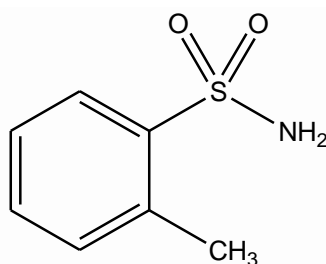
Tabela 1- Parâmetros de validação sugeridos pelo Inmetro

INMETRO
Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
Linearidade
Curva de Calibração
Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva) -
Exatidão e tendência (bias)
Precisão
Repetitividade
Precisão Intermediária
Reprodutibilidade
Robustez
Incerteza de medição

### 1.3. Orto- toluenosulfonamida (OTSA)

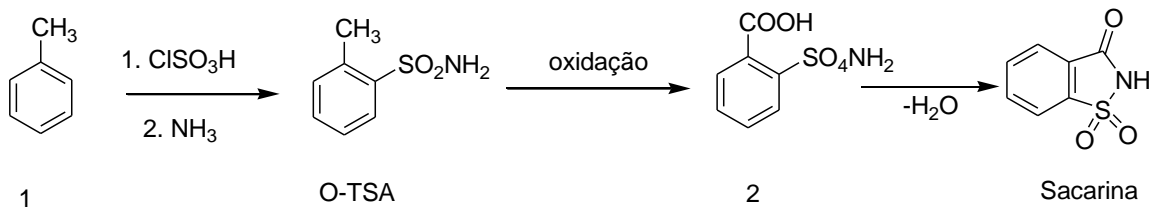
O OTSA é um composto orgânico de massa molar  $171,72 \text{ g mol}^{-1}$  e fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ , sua estrutura é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Orto- toluenosulfonamida



Importante precursor na síntese do edulcorante Sacarina (primeiro adoçante artificial conhecido desde 1879), de acordo com Lima et al. (2010), a síntese se baseia na oxidação e na posterior desidratação, de acordo com Ager et al. (1998) do composto, como se pode observar na Figura 3.

Figura 3 – Esquema representando a síntese de orto-toluenosulfonamida, de acordo com Ager et al. 1998



Estudos atribuem à sacarina características carcinogênicas, seguindo Krowech et al. (2003) e Hooson et al. (1980) e seu uso diverge opiniões em países desenvolvidos. Recentemente órgãos regulamentadores dos Estados Unidos da América, baseados no Departamento de Serviços Humanos e da Saúde do Programa Nacional de Toxicologia, retiraram a sacarina da lista de produtos com pronunciado potencial danoso à saúde humana, seguindo “California Office of Environmental Health Hazard Assessment” (OEHHA) e DEMERS (1981)

Devido à falta de esclarecimento do uso seguro de sacarina, mais estudos estão sendo realizados, inclusive com seus precursores seguindo OEHHA. Existe apenas uma recomendação da Farmacopeia Europeia (2011 p.2877) sobre níveis aceitáveis de OTSA em sacarina, sendo esse  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , a Farmacopeia Europeia também sugere uma metodologia utilizando cromatografia gasosa, porém essa metodologia requer uma infraestrutura mais elaborada devido a sistema de gases utilizados no cromatógrafo, o que torna inviável essa implementação em uma empresa. Estudos toxicológicos de OTSA também são limitados, algo preocupante em questão de saúde pública.

## **2. Objetivo**

### **2.1 Objetivo Geral**

Propor sistemática confiável para o controle de qualidade do edulcorante sacarina produzido comercialmente.

### **2.2 Objetivo Específico**

- Estabelecer metodologia confiável para instalações de controle de qualidade;
- Validar metodologia analítica para determinação e quantificação de orto-toluenosulfonamida em matriz do edulcorante sacarina, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-VIS;
- Otimizar os de parâmetros analíticos para a técnica proposta;
- Avaliar a viabilidade de enquadramento do ensaio em normas técnicas de qualidade laboratorial (NBR/ISO 17025).

### **3. Introdução**

A estratégia de oxidação e desidratação de OTSA é usualmente empregada em empresas nacionais de sacarina, tanto partindo de OTSA comercial ou envolvendo etapas anteriores para sua obtenção.

Visando um controle de qualidade eficiente de empresas produtoras de sacarina, a quantificação de impurezas é de essencial importância para alavancar o potencial competitivo das mesmas proporcionando um produto dentro do padrão de qualidade especificado para o consumo.

Com o auxílio da química analítica, a quantificação de diversos analitos se torna facilitada e com o avanço da tecnologia e da ciência o uso de aparatos instrumentais aumentou a gama de compostos que podem ser identificados e quantificados com um grau de precisão elevado. Necessitando apenas estudos que asseguram sua confiabilidade, esses estudos são denominados de validação de metodologia.

Nesse trabalho será abordado o desenvolvimento e a validação de parâmetros analíticos na quantificação de OTSA em matriz sacarina e a viabilidade econômica de instauração em um controle de qualidade de uma produtora do edulcorante.



## 4. Metodologia

### 4.1 Controle de Qualidade

Implementar um novo ensaio no sistema de qualidade de uma indústria é viável quando dois principais fatores são analisados. A eficiência da metodologia utilizada deve ser assegurada e os parâmetros financeiros envolvidos devem ter o menor custo possível para ser atrativo ao empreendedor. Esses dois principais fatores são levados em consideração no desenvolvimento dessa proposta de ensaio.

### 4.2 Materiais e Métodos

A Tabela 2 apresenta as informações dos reagentes utilizados para o ensaio do OTSA.

Tabela 2 - Reagentes usados no ensaio

Reagente	Marca	Lote	Teor (%)	Validade
o-toluenossulfonamida	Aldrich	MKBJ0460V	99,9	25/03/2017
Acetonitrila	Sigma-Aldrich	SZBCZ125V	99,9	11/06/2016
Acetonitrila	Dinâmica	57573	99,99	--/04/2017
Água Ultrapura*	-	-	-	-

\*A água Ultrapura utilizada nas soluções foi purificada com sistema Millipore e possui resistividade de 18.2 MΩ-cm.

Os equipamentos utilizados e materiais volumétricos devidamente calibrados usados no preparo das soluções estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Equipamentos e instrumentos volumétricos

Equipamentos	Marca	Código/ Lote	Data de calibração
HPLC Shimadzu	Shimadzu	-	n.a.
Balança	Chyo JK-200	7403/2013	17/04/2013
Micropipeta (100µL-1000 µL)	Brand		22/07/2013
Pip. vol de 2 mL	Brand	07.05	
Pip. vol de 5 mL	Brand	12.05	
Pip. vol de 10 mL	Brand	12.05	
Pip. vol de 15 mL	Brand	06.05	
Bal. vol de 100 mL	Brand	06.04	

n.a. = não aplicável n.d. = não disponível

Pip. vol = pipeta volumétrica; Bal. vol = balão volumétrico.

### 4.3 Preparo das Soluções

A solução estoque de OTSA foi preparada com acetonitrila e água, na proporção volumétrica de 50:50, em concentração de  $104 \text{ mg L}^{-1}$ . A Tabela 4 apresenta o volume de cada alíquota da solução estoque utilizada e diluída em balões volumétrico de 100 mL, para a construção da curva analítica.

Tabela 4 - Volume de solução estoque de orto-toluenosulfonamida utilizada e concentração final em cada nível

	Volume de Solução Estoque de OTSA (mL)	Concentração do Nível ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Nível 1	0,5	0,5
Nível 2	2	2,1
Nível 3	5	5,2
Nível 4	10	10,4
Nível 5	15	15,6

Um estudo na forma de carta controle foi realizado e a validade de 30 dias ficou estabelecida para a solução padrão e para as soluções que dela derivam. As soluções usadas para curva analítica derivam de diluições da solução estoque e variam entre concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $15,6 \text{ mg L}^{-1}$  oriundas das diluições.

### 4.4 Preparo das amostras

#### 4.4.1 Preparo de amostra de trabalho

A preparação de amostras para esse ensaio se baseia na formulação de uma solução contendo  $0,0102 \text{ g}$  ( $\pm 0,005 \text{ g}$ ) de sacarina sólida em balão volumétrico de 100 mL. Quando necessário, foram feitas diluições.

#### 4.4.2 Preparo de amostra fortificada

Para o teste de recuperação foram preparadas soluções de amostras de sacarina sólida comercial com adição de padrão em 3 níveis de concentração. Na tabela 5 tem-se a concentração de padrão adicionado.

Tabela 5 - Concentração de Orto-Toluenosulfonamida adicionada à soluções de amostra de trabalho

Nível 1 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nível 3 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nível 5 ( $\text{mg L}^{-1}$ )
0,5	5,2	15,6

### 4.5 Validação da metodologia

Para a realização da validação, análises dos parâmetros subscritados foram realizados.

### 4.5.1 Seletividade

Pela possibilidade de existência de componentes na matriz que interfiram, aumentando ou reduzindo sinais, afetando o desempenho da medição, experimentos específicos foram realizados para avaliar a seletividade.

Uma amostra comercial de sacarina que poderia conter interferentes foi inicialmente analisada. Posteriormente amostras fortificadas com OTSA em 3 níveis de concentração também foram submetidas a análise. A seletividade é determinada pela comparação dos cromatogramas da solução padrão com diluentes e com a matriz avaliada. Se nenhum sinal dos cromatogramas do diluente ou da matriz, interferir no sinal relativo ao analito em questão e o resultado da resolução for superior a 2, o método é considerado seletivo.

### 4.5.2 Linearidade e faixa de aplicação

Para a determinação desse parâmetro, foram analisados em triplicata os pontos da curva, preparados conforme item 4.2. A curva foi obtida graficando a concentração teórica pelas áreas obtida instrumentalmente. Os dados foram tratados estatisticamente. O teste de COCHRAN foi utilizado para comparação das variâncias, o gráfico de resíduos para verificar tendências e o cálculo do  $r^2$  do modelo linear, foi graficamente obtido.

### 4.5.3 Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou amostras semelhantes; sob condições definidas. É expresso na forma de desvio padrão relativo (DPR). Ensaios de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade foram realizados com análise de soluções padrões.

#### 4.5.3.1 Reprodutibilidade

Definido como o grau de concordância de resultados de uma mesma amostra em questão. Determinado através de cálculos estatísticos, “Ensaio de Horrat”, visando que o estudo colaborativo entre laboratórios e a realização de programas interlaboratorial é inviável para o método em questão. Usando o desvio padrão relativo dos níveis baixo, médio e alto da curva analítica realizados em triplicata e valores de Horwitz sob o critério de aceitação numérico 2, sugerido pelo INMETRO.

$$\text{Valor de Horrat} = \frac{\text{DPR (oriundo dos ensaios desenvolvidos)}}{\text{DPR (previsto da equação de Horwitz)}}$$

Valor de Horwit:

$$\text{DPR} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Onde:

C = razão de concentração do analito.

#### 4.5.3.2 Precisão Intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório, ligados a eventos como diferentes analistas, equipamentos diferentes ou até condições climáticas diferenciadas na determinação do analito em questão. A estratégia usada para determinar a precisão intermediária foi a comparação por meio do teste estatístico “teste f” de 7 amostras analisadas por um analista com 7 amostras preparadas e analisadas por outro analista em um momento diferente.

#### 4.5.3.3 Repetitividade

As condições de repetitividade foram seguidas sendo caracterizadas utilizando o mesmo método de medição, mesmo observador, mesmo instrumento de análise, sob as mesmas condições no mesmo local e no menor espaço de tempo possível de 7 amostras distintas semelhantes.

#### 4.5.4 Exatidão

Ligada diretamente à concordância entre valores individuais relacionados a um ensaio e um valor de referência dito como verdadeiro. Ressaltando que o valor exato ou verdadeiro é obtido de uma medição perfeita, ou seja, é indeterminado por natureza.

Os processos adotados com maior frequência para avaliar a exatidão de um método são: uso de material de referência; adição de padrão, comparação de métodos e, o utilizado nesse trabalho, ensaios de recuperação. Quando relacionada a uma série de resultados, a tendência se faz em uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos. Utilizando soluções fortificadas descritas no item 4.3.2, realizou-se o seguinte cálculo para cada nível de concentração:

$$R(\%) = \left( \frac{C_f - C_{nf}}{C_t} \right) \times 100$$

Onde:

$C_f$  = concentração do analito na amostra fortificada

$C_{nf}$  = concentração do analito na amostra não fortificada (branco da matriz)

$C_t$  = concentração total do analito adicionada à amostra fortificada

#### 4.5.5 Limite de Detecção

Para a determinação do limite de detecção do método, que representa a menor concentração detectável para a metodologia, foram realizadas duas sucessivas diluições do ponto mais baixo da curva até o momento que a altura do

sinal do analito de interesse apresentasse uma magnitude aproximadamente 3 vezes maior que o ruído do equipamento (método da relação sinal-ruído com relação 3:1).

#### 4.5.6 Limite de Quantificação

Representando a menor concentração que pode ser quantificada utilizando o método em questão, o limite de quantificação foi determinado pelo método visual realizando 7 replicatas com o sinal do analito numa relação 10:1 com o ruído instrumental.

#### 4.5.7 Robustez

A robustez estima a sensibilidade que o método apresenta perante pequenas variações de parâmetros definidos. A robustez do método foi garantida realizando o teste de Youden. Os parâmetros avaliados foram temperatura da sala onde foram realizado os ensaios (25°C/23°C), comprimento de onda do detector ( 268 nm e 270 nm), solventes usados para preparar a solução estoque (H<sub>2</sub>O/ ACN / H<sub>2</sub>O), diferentes operadores e preparadores de amostra (Operador 1/ Operador 2), Fluxo da fase móvel (1 mL/ 0,8 mL), concentração de acetonitrila usada na fase móvel (50%/52%) e marca da acetonitrila usada (Merck/ Dinamica).

#### 4.5.8 Testes estatísticos

Testes estatísticos foram realizados com o objetivo de identificar valores discrepantes entre as vias analisadas.

**Teste de Grubbs:** valor discrepante

Valor mínimo:

$$G_1 = \frac{(\bar{x} - x_1)}{s}$$

onde:

$x_1$  = valor mais baixo

s = desvio padrão das replicatas

Valor Máximo

$$G_n = \frac{(x_n - \bar{x})}{s}$$

onde:

$x_n$  = valor mais alto

s = desvio padrão das replicatas

**Teste F-Snedecor:** comparação de variância

$$F_{observado} = \frac{S_{máx}^2}{S_{mín}^2}$$

Onde:

$S^2_{\text{máx.}}$  = maior variância

$S^2_{\text{mín.}}$  = menor variância

Sendo a variância ( $S^2$ ):

$$S^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}$$

Onde:

n = número de replicatas

$y_i$  = cada resultado obtido

$\bar{y}$  = média aritmética

**Teste de Cochran:** Homogeneidade de Variância

$$C = \frac{S^2_{\text{max}}}{\sum S^2}$$

Onde:

$S^2_{\text{máx.}}$  = maior variância

$\sum S^2$  = somatória das variâncias

#### 4.6 Análise Instrumental

A análise instrumental foi realizada em um cromatografo líquido de alta eficiência Shimadzu; equipado com bomba binária módulo, LC-10ADVP; detector UV/VIS, SPD-10AVVP e módulo de controle de sistema SCL-10AVP. Os dados obtidos foram analisados usando o software "Shimadzu CLASS – VP", versão 6.14 SP1 e planilhas desenvolvidas exclusivamente para esse trabalho de validação.

As condições instrumentais da técnica são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições de análise por cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de UV-Vis

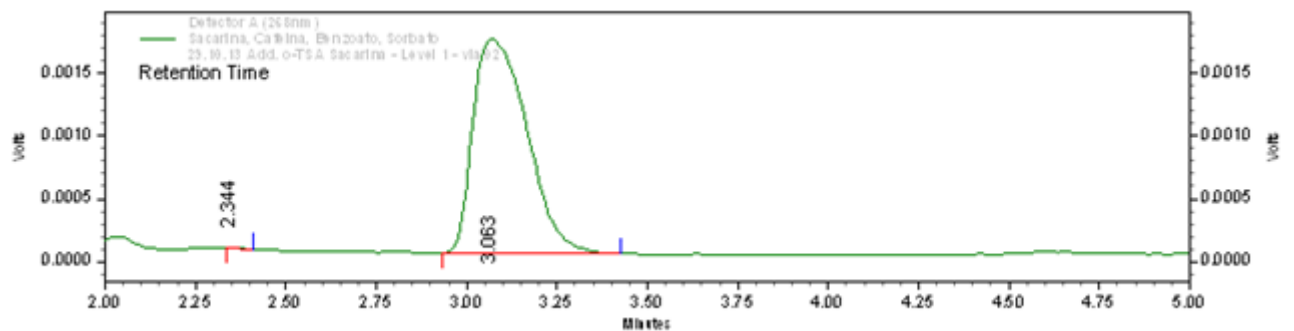
Parâmetro	Valores
Coluna	Inertsil/ODS – 4 C18, 150 mm x 4,6 mm x 5 µm
Temperatura	Ambiente
Volume de injeção	20 µL
Fluxo da Fase Movel	1 ml min <sup>-1</sup>
Fase Móvel (Isocrático 50%/50%)	A – H <sub>2</sub> O Ultra Pura B – Acetonitrila
Comprimento de onda (λ)	268 nm

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Seletividade

Na Figura 4 é evidenciado um cromatograma típico de OTSA na matriz de sacarina.

Figura 4 - Cromatograma de amostra de sacarina com adição de Orto-Toluenosulfonamida na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$



Na tabela 9 podemos observar os resultados para os cálculos de resolução e variação do tempo de retenção para a adição de OTSA em sacarina na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Tabela 7 - Tempos de retenção para a adição de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Orto-Toluenosulfonamida em matriz sacarina

	Via	Tempo de retenção (min)	Tempo inicial (min)	Tempo final (min)
Pico 1	1	2,35	2,33	2,41
	2	2,34	2,33	2,40
	3	2,34	2,31	2,38
O-TSA	1	3,06	2,93	3,41
	2	3,06	2,93	3,42
	3	3,05	2,93	3,42

Tabela 8 - Tempos de retenção para padrão de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Orto-Toluenosulfonamida

	Via	Tempo de retenção (min)	Tempo inicial (min)	Tempo final (min)
O-TSA	1	3,05	2,89	3,42
	2	3,06	2,91	3,46
	3	3,06	2,92	3,44

Tabela 9 - Resultados dos cálculos de resolução e variação de tempo de retenção para a matriz.

	Via	Resolução	Variação do tempo de retenção (%)
O-TSA	1	2,53	0,07
	2	2,58	
	3	2,50	

A variação inferior a 5% entre a média dos tempos de retenção das amostras de sacarina adicionada e do padrão, ambos na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> e uma resolução maior que 2,0 evidenciam um resultado satisfatório quanto à seletividade da metodologia.

### 5.1.1 Efeito da Matriz

Na Tabela 10 é apresentado os valores da recuperação instrumental de OTSA fortificada na matriz sacarina em três diferentes níveis de concentração. E na Tabela 11 são apresentados os resultados para o Teste de Grubbs para os valores mais discrepantes da média em replicatas para os 3 níveis de concentração analisados. O valor de  $G_{\text{tabelado}} = 1,15$  para  $n = 3$ .

Tabela 10 - Valores de recuperações de orto-toluenosulfonamida em sacarina

	Recuperação (%)
Nível Baixo	98
Nível Médio	100
Nível Alto	101

Tabela 11- Resultado do teste de Grubbs para a matriz sacarina nos maiores e menores valores das replicatas em cada nível de concentração

Composto	$G_{\text{Maior valor}}$	$G_{\text{Menor valor}}$	$G_{\text{tabelado}}$	$G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$
Concentração Baixa	0,90	1,07	1,15	Aceito
Concentração Média	1,09	0,87	1,15	Aceito
Concentração Alta	1,14	0,74	1,15	Aceito

O resultado dos teste de recuperação (com critério de aceitação de  $\pm 5\%$ ) é satisfatório e com a ajuda de testes estatísticos, confirmamos a seletividade da metodologia, descartando a influencia da matriz sacarina na análise de OTSA ao longo da faixa de trabalho. As vias analisadas somente com o diluente, água ultrapura e acetonitrila, não apresentaram nenhum sinal que possa interferir na análise.



## 5.2 Linearidade

Na Tabela 12 constam os valores das áreas das replicatas referentes a cada nível de concentração, testes estatísticos foram realizados para evitar *outliers* e o gráfico das concentrações pela área resultou na curva analítica.

Tabela 12 - Áreas das três injeções de cada nível de concentração da curva analítica.

Nível	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Leituras das Áreas			CV(%)
		1	2	3	
1	0,5	3979	3909	3983	0,9
2	2,1	16139	16146	16194	0,2
3	5,2	40141	40574	40240	0,5
4	10,4	81717	80916	81132	0,4
5	15,6	124511	123511	122314	0,7

Nas figuras 5 e 6 estão apresentados, respectivamente, os gráficos da curva analítica do *orto*-toluenosulfonamida e de resíduos da curva.

A correlação linear obtida na figura 5 demonstra que o método proposto apresenta linearidade para a faixa de trabalho estabelecida, com  $r^2 > 0,99$ .

Figura 5 - Gráfico da curva analítica do Orto-Toluenosulfonamida

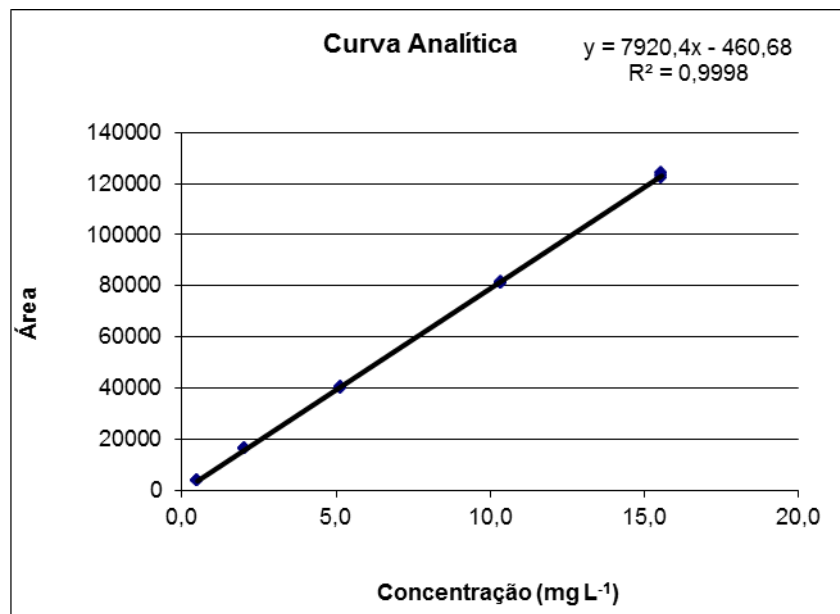
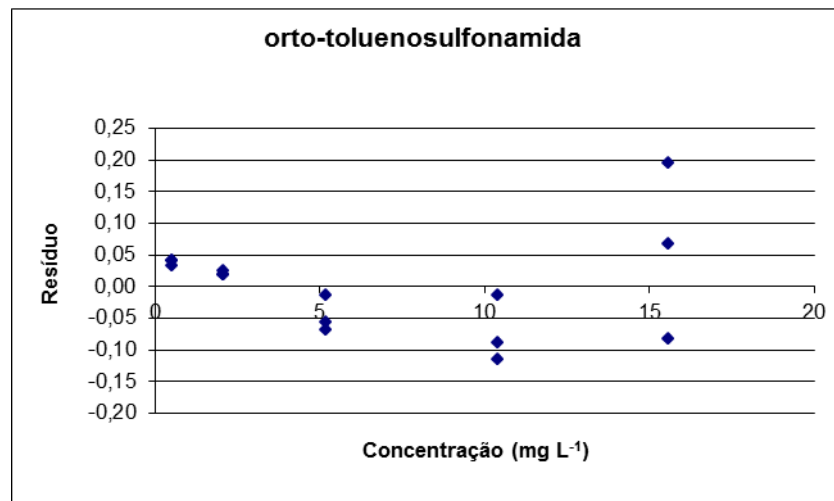


Figura 6 - Gráfico de resíduos



Na figura 6 o gráfico de perfil de resíduos demonstra a ausência de tendências ao longo da faixa de trabalho. O resultado do teste de Cochran, ou seja, o valor de  $C_{\text{calc}}$  foi de 0,440 representando a homogeneidade da variância dos resíduos, visto que o valor tabelado para  $l=5$  e  $n=3$  é de  $C_{\text{tab}} = 0,684$ .

Na Tabela 13 constam os valores do coeficiente angular, coeficiente linear e a correlação linear quadrática ( $r^2$ ) referente à curva.

Tabela 13 - Valores de coeficiente angular, coeficiente linear e correlação linear quadrática da curva analítica.

Composto	Coef. Angular	Coef. Linear	Cor. Linear Quadrática
OTSA	7920,36	-460,68	0,9998

### 5.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho estabelecida ficou definida como a região linear estabelecida pela curva analítica. Na faixa de concentração entre  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  -  $15,6 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 5.4 Precisão

#### 5.4.1 Reprodutibilidade

Fazendo uma avaliação teórica da precisão do método utilizam-se os valores de Horrat com os DPR obtidos com os níveis 1, 3 e 5 da curva descrita no item 5.2. Utilizando a razão de concentração de  $10^{-6}$  referente a  $\text{mg L}^{-1}$  (unidade usada na validação da metodologia) o DPR previsto pela equação de Horwitz é 16. A Tabela 14 apresenta os valores de Horrat para o composto utilizado.

Tabela 14 - Valores de Horrat para Orto-Toluenosulfonamida utilizando a razão de concentração de  $10^{-6}$  referente à magnitude da escala utilizada ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Valores de Horrat	
Nível 1	0,056
Nível 3	0,031
Nível 5	0,044

O critério de aceitação estabelecido - valores de HORRAT menores ou iguais 2 – para a precisão intermediária e a reprodutibilidade do método foi atendido.

#### 5.4.2 Precisão Intermediária e Repetitividade

As tabelas 15 e 16 evidenciam 14 amostras semelhantes analisadas separadamente em duas condições diferentes, por operadores e preparadores de amostra diferentes.

Tabela 15 – Ensaio de precisão intermediária utilizando condição 1 (Operador 1/ Preparador de amostra 1)

	Média das Áreas	Média das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DPR (%)
Amostra 1	42239,7	5,4	0,42
Amostra 2	42349,3	5,4	0,21
Amostra 3	43341,7	5,5	1,22
Amostra 4	43952,7	5,6	0,46
Amostra 5	43774,0	5,6	0,66
Amostra 6	43923,0	5,6	0,54
Amostra 7	43925,3	5,6	0,20

O DPR do estudo com os 7 ensaios da condição 1 para ensaio de precisão intermediária é 0,0955. A repetitividade é assegurada com esse DPR, para um critério de aceitação de 95%.

Tabela 16 – Ensaio de precisão intermediária utilizando condição 2 (Operador 2/ Preparador de amostra 2)

	Média das Áreas	Média das concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	DPR (%)
Amostra 1	38099,7	4,9	1,80
Amostra 2	39159	5,0	0,54
Amostra 3	38760,7	5,0	1,11
Amostra 4	41059	5,2	0,66
Amostra 5	38821,7	4,9	1,36
Amostra 6	38821,7	5,0	0,51
Amostra 7	38953	5,0	0,54

O DPR do estudo com os 7 ensaios da condição 2 para ensaio de precisão intermediária é 0,121. A repetibilidade é assegurada com esse DPR(%), para um critério de aceitação de 95%.

O resultado do test F é  $F_{cal} = 1,599$ , para  $F_{tab} = 3,79$  para um critério de aceitação de 95% e grau de liberdade 7. Aceitando a relação das variâncias das metodologias comparadas.

### 5.5 Limite de Quantificação

Substituindo-se as áreas, obtidas pela injeção de sete replicatas, na equação da curva analítica adequada obtém-se os resultados apresentados na Tabela 17, evidenciamos então o limite de quantificação.

Tabela 17 - Resultados limite de quantificação para Orto-Toluenosulfonamida.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
0,6			
0,5			
0,6			
0,6	0,6	0,01	2
0,5			
0,6			
0,5			

### 5.6 Limite de Detecção

Seguindo a metodologia da relação sinal-ruído, o valor da área do sinal do analito em questão após as diluições do ponto mais baixo da curva está apresentado na Tabela 18, bem como sua concentração calculada a partir da regressão linear.

Tabela 18 - Resultado da injeção mais diluída

	Área da via mais diluída	Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) da via mais diluída
O-TSA	581	0,1

### 5.7 Robustez

A Tabela 19 exemplifica a combinação das variações para a aplicação do Teste de Youden que consiste na análise multivariada de variações que podem influenciar o resultado analítico. Assim para verificar a robustez do método foram selecionadas sete (07) variáveis totalizando oito (08) ensaios, as letras maiúsculas representam as condições utilizadas no método original e as letras minúsculas representam as variações realizadas para verificar a robustez do método.

Tabela 19 – Teste de Youden, parâmetros variados para estudo de robustez

Variável	Condição Normal	Condição Alternativa	Combinação Fatorial							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura	25 ° C (A)	23 ° C (a)	A	A	A	A	a	A	A	A
Comp. de onda	268 nm (B)	270 nm (b)	B	B	B	b	B	B	B	B
Sol. Estoque	H <sub>2</sub> O/ACN (C)	H <sub>2</sub> O (c)	C	c	C	c	C	C	C	C
Operador	Op. 1 (D)	Op. 2 (d)	D	D	D	d	d	D	D	D
Fluxo	1,0 mL min <sup>-1</sup> (E)	0,8 mL min <sup>-1</sup> (e)	E	e	E	e	e	E	E	E
Proporção ACN	50% (F)	52% (f)	F	f	F	F	F	F	F	F
Marca ACN	Merck (G)	Dinâmica (g)	G	g	G	G	g	G	G	G
<b>Resultado</b>	-	-	S	t	U	v	w	X	Y	Z

A Tabela 20 mostra a variação dos resultados (tempo de retenção; área) em estudo pelo Teste de Youden. Pequenas variações resultam em alterações nas respostas instrumentais, observando a influencia das condições na variação do tempo de retenção do analito o desvio de 0,21 minutos pela mudança da proporção de acetonitrila na composição da solução estoque (condição C/c); uma variação de 0,17 minutos, resultado da alteração do fluxo de análise (condição E/e) e uma variação de 0,169 minutos oriunda da mudança de marca de acetonitrila (condição G/g). Os fatores mais influentes; que serão descritos; em ordem decrescente, resultam em variações na área do composto estudado. A marca da acetonitrila (condição G/g), o operador e preparador de amostra (condição D/d) e o uso de um comprimento de onda diferente (condição B/b).

Tabela 20- Resultados do Teste de Youden em varrições de tempo de retenção e área com variação de parâmetros de A-G

	Rt (min)	Área
A-a	0,09	-5258,83
B-b	0,14	-2538,67
C-c	-0,21	-17773,7
D-d	0,17	18644,83
E-e	-0,21	-8670,17
F-f	-0,17	-225,333
G-g	-0,17	-21940,8

## 6. Amostra comercial e Pureza

A fim de avaliar o método validado, foram realizados dois ensaios. Um com uma amostra comercial de sacarina e outro com amostra comercial de OTSA.

Tabela 21 - Ensaio de Orto-Toluenosulfonamida em sacarina (realizado com uma diluição de 10 vezes)

	Massa pesada (g)	Área	Massa do analito(g)	% (OTSA)
Via 1	0,0104	41587	0,0053	51,0
Via 2	0,0104	40714	0,0052	50,0
Via 3	0,0104	41417	0,0053	51,0
Média	0,0104	-	0,0053	50,6

Tabela 22 - Ensaio de Orto-Toluenosulfonamida comercial (realizado com uma diluição de 20 vezes)

	Massa pesada (g)	Área	Massa do analito (g)	% (OTSA)
Via 1	0,0104	36860	0,0094	90,4
Via 2	0,0104	36574	0,0094	90,4
Via 3	0,0104	36523	0,0093	89,4
Média	0,0104	-	0,0094	90,1

Devido às péssimas condições de armazenagem de sacarina comercial e OTSA obtidas de um comerciante local, observamos a porcentagem de OTSA muito superior ao limite estabelecido na farmacopeia europeia na amostra de sacarina e um valor razoável na amostra de OTSA comercial.

## 7. Precificação

Para implementação exclusiva desse ensaio no sistema de controle de qualidade, haverá a necessidade de um investimento de **R\$ 228.677,00** baseado na precificação descrita na Tabela 23, que inclui a aquisição de um cromatógrafo juntamente com seus componentes para perfeito funcionamento, vidraria necessária e demais itens essenciais. A execução do ensaio por 4 horas (tempo necessário para construir curva analítica e realizar 9 ensaios distintos em triplicata) requer um investimento descrito na Tabela 24 relativo a consumíveis químicos e recursos humanos alocados para a função .

Tabela 23 – Precificação para instalação

Item	Preço Bruto
Cromatógrafo Líquido*	R\$ 180.000,00
Pré-coluna**	R\$ 1.375,00
Acessórios laboratoriais *** (Vidraria, micropipetas, etc)	R\$ 4.000,00
Balança Analítica****	R\$ 3.302,20
Utilitários	R\$ 40.000,00
<b>Total</b>	<b>R\$ 228.677,00</b>

\*Orçamento Shimatzo

\*\*<http://www.sigmaldrich.com/>

\*\*\*<http://www.cbbiotech.com/>

\*\*\*\* <http://www.lojalab.com.br/>

Tabela 24 - Precificação da rotina

	Preço Bruto	Preço médio para 4 horas de ensaio.
Acetonitrila 99,9%*	R\$ 1335, 00*** (7 litros)	R\$ 57,22
Padrão de OTSA*	R\$ 209,00*** (25 g)	R\$ 0,05
Técnico em Química**	R\$ 2900, 00	R\$ 48,33
<b>Total</b>		<b>R\$ 105,60</b>

\*<http://www.sigmaldrich.com/>

\*\*<http://www.aquitemrh.com.br/>

\*\*\* Preço em reais, convertido do valor em dólar comercial em 30 de maio de 2014.

## **8. Conclusões**

Implementar um sistema de controle de qualidade confiável e efetivo é possível pelos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de validação estudados para a determinação de OTSA por cromatografia líquida de alta eficiência, tendo como base o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 – Revisão 4, Orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO.

O baixo custo de manutenção do ensaio em comparação com o alto valor a ser investido para a aquisição de todos os aparatos necessários deve ser tomado em consideração pelo empreendedor na escolha de implementar a técnica cromatográfica no controle de qualidade da indústria. Associado com outras metodologias cromatográficas para análise de outros analitos relacionados ou não com a sacarina essa opção se torna muito mais atrativa.

O enquadramento do ensaio em normas técnicas de qualidade laboratorial é plenamente viável porém exige treinamento adequado e enquadramento na norma técnica de ensaios laboratoriais ISO/EC 17025.



## 9. Referências bibliográficas

Ager D. J. ; Pantaleone D. P.; Henderson S. A.; Katritzky A. R.; Prakash I.; Walters D. E.; **Commercial, Synthetic Nonnutritives Sweeteners**; Angewandte Chemie. International edition in English; vol. 37, no13-14, pp. 1802-1817; 1998.

BARROS, C. B. **Validação de Métodos Analíticos**. Biológico, São Paulo, v.64,n.2, p.175-177, jul./dez. 2002

**California Office of Environmental Health Hazard Assessment: banco de dados.** Disponível em: <[http://www.oehha.ca.gov/prop65/CRNR\\_notices/chemicals\\_reconsideration/fdelists\\_acc.html](http://www.oehha.ca.gov/prop65/CRNR_notices/chemicals_reconsideration/fdelists_acc.html)>. Acessado em 02 junho de 2014

**California Office of Environmental Health Hazard Assessment: banco de dados.** Disponível em: <[http://www.oehha.ca.gov/prop65/hazard\\_ident/pdf\\_zip/sodiumsaccharin\\_finalhid.pdf](http://www.oehha.ca.gov/prop65/hazard_ident/pdf_zip/sodiumsaccharin_finalhid.pdf)>. Acessado em 02 junho de 2014

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos** .5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

DEGANI, A.L.G; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia, um breve ensaio**, Química Nova na Escola N° 7, p. 21-25 MAIO 1998

Demers, D.M; Fukushima S.;Cohen, S.M.; **Effect of Sodium Saccharin and L-Tryptophan on Rat Urine during Bladder Carcinogenesis**, Cancer Res January 41:108-112, 1981

**EUROPEAN Pharmacopoeia**. 7° Ed Vol 2, 2011. p.2877.

Hopson, J., Hicks, R. M., Grasso, P., and Chowaniec, J. **Ortho-toluenesulphonamide and saccharin in the promotion of bladder cancer in the rat**. Brit. J. Cancer 42: 129- 147 (1980).

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2011

International Standard Organization; **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**, ISO/EC 17025, 1999.

LIMA, Jhonatas de Souza; DIAS, Mauro Cesar; MATENCIO, Túlio. **Aplicação da espectroscopia no infravermelho e difração de raio-X na determinação de sacarina em adoçantes líquidos artificiais pelo método volumétrico com Ag<sup>+</sup>**. Eclét. Quím., São Paulo , v. 35, n. 4, 2010 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702010000400003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400003&lng=en&nrm=iso)>.

Acessado 19 Junho 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702010000400003>.

MUHLEN, Carin von; LANCAS, Fernando Mauro. **Cromatografia unificada**. Quím. Nova, São Paulo , v. 27, n. 5, Oct. 2004 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000500014&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500014&lng=en&nrm=iso)>.

Acessado em 19 Junho 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500014>.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; "**Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**". Química Nova 27 (2004) 771-780.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8.ed. Ames, Iowa State University Press, 1989. 503 p.

TAYLOR, R.J.; Chichester; John Wiley Sons. **Food additives**. Biochemical Education v.10, p 126 1980.

---