

# Determinação de Trietil Citrato, Etilhexilglicerina e Farnesol em Desodorizantes e Antitranspirantes: Precisão e comparação entre métodos

LUCIANA PATRÍCIA DA SILVA ALMEIDA

novembro de 2018

# **Determinação de Trietil Citrato, Etilhexilglicerina e Farnesol em Desodorizantes e Antitranspirantes: Precisão e comparação entre métodos**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Departamento de Engenharia Química

Mestrado em Engenharia Química, ramo de especialização em Qualidade

**Orientação:**

Susana Sousa

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Raquel Bastos

Colep Portugal, S.A.

Luciana Patrícia da Silva Almeida

Novembro 2018



## Agradecimentos

Antes de mais, quero agradecer à Engenheira Susana Sousa, por toda a sua imensa disponibilidade e orientação, que foram imprescindíveis para o presente trabalho.

Agradeço à Raquel Bastos pela oportunidade de realizar este estágio na Colep e pela sua colaboração e acompanhamento na empresa.

Deixo também um grande obrigado a toda a equipa do Departamento Técnico por toda a ajuda e apoio demonstrados durante estes meses. Ainda a toda a equipa do laboratório pela boa disposição e cooperação que permitiram todo um ambiente propício a uma aprendizagem e desenvolvimento inegáveis. A todos os restantes colaboradores da Colep por todas as informações e enorme simpatia.

Aos meus amigos, que de uma forma direta ou indireta, contribuíram na elaboração do presente trabalho e por todas as palavras de encorajamento, motivação e paciência durante todo este percurso académico.

Por último, um agradecimento especial à minha família pela sua força e total apoio, à minha madrinha por toda preocupação e compreensão que sempre demonstrou e, principalmente, aos meus pais e irmã por todo o incentivo e por acreditarem incessantemente que seria capaz de chegar tão longe, embora nunca o tivesse conseguido sem eles.



## Sumário

O presente trabalho insere-se no âmbito da unidade curricular de “Dissertação/Estágio” do Mestrado em Engenharia Química, na área de especialização de Qualidade, a realizar em contexto industrial na empresa Colep, sediada em Vale de Cambra.

Tratando-se a Colep de uma empresa líder em *contract manufacturing* e com fábricas em todo o Mundo, é necessário assegurar que os métodos utilizados para a determinação de qualquer componente solicitado pelo cliente, sejam métodos devidamente validados e com resultados de confiança. O estágio em questão teve como objetivo a avaliação da precisão, nomeadamente a repetibilidade e precisão intermédia, na determinação de Trietil Citrato (TEC), Etilhexilglicerina (Sensiva) e Farnesol em desodorizantes e antitranspirantes. Estes compostos são adicionados ao produto na sua formulação procurando proporcionar as mesmas propriedades emolientes, surfactantes, antimicrobianas, entre outras.

A determinação de TEC, Sensiva e Farnesol foi efetuada por Cromatografia Gasosa com Detetor por Ionização de Chama (GC-FID). Foram executados dois métodos, Método A, fornecido por um cliente e o Método B, desenvolvido pela empresa, por dois operadores, 1 e 2. A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermédia. Foi ainda efetuada a comparação entre os dois métodos.

Verificou-se uma melhor repetibilidade para o operador 1 que para o operador 2 nos dois métodos. O coeficiente de variação associado ao operador 2 foi superior a 10% em algumas determinações.

Para a precisão intermédia, de cada princípio ativo e para cada método considerou-se a variação da variável operador. Todos os resultados obtidos foram inferiores a 10%, exceto para as áreas da amostra relativamente ao TEC e Sensiva no Método B.

Pretendeu-se verificar se existiam diferenças significativas entre os métodos A e B, relativamente às suas precisões, efetuando-se o teste Fisher-Snedecor. Verificou-se que na determinação de TEC e Farnesol não se observaram diferenças significativas ao contrário do que se constatou na determinação de TEC e Sensiva.

Por fim, concluiu-se que o produto estava conforme uma vez que as percentagens de TEC, Sensiva e Farnesol obtidas se apresentaram dentro do intervalo de valores especificados para ambos os métodos.

**Palavras-chave:** Cromatografia Gasosa, Trietil Citrato, Etilhexilglicerina, Farnesol, Repetibilidade, Precisão Intermédia, Comparação de métodos.



## Abstract

This thesis falls within the context of the curricular unit of “Dissertation/Internship” of Master in Chemical Engineering, branch in Quality, carried out in an industrial context at Colep, located in Vale de Cambra.

Since Colep is a leading contract manufacturing company with factories all over the world, it is needed to ensure that the methods used to determine any component requested by the client, that can be effectively performed and with reliable results. The main goal was assessment of precision of Triethyl Citrate (TEC), Ethylhexylglycerine (Sensiva) and Farnesol in deodorants and antiperspirants. These compounds are added in the product formulation to provide emollient, surfactant and antimicrobial properties, among others.

The determination of TEC, Sensiva and Farnesol was carried out by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID). Two methods were performed by two operators, 1 and 2, Method A, provided by a customer and the Method B, developed by the company. The precision was evaluated through repeatability and intermediate precision.

A better repeatability was found for operator 1 than for operator 2 in both methods. The coefficient of variation of more than 10% was observed for operator 2 in some determinations.

Concerning the intermediate precision of each active principle and for each method, the operator was the variable changed. All the coefficient of variation obtained were less than 10%, except for the sample areas relative to TEC and Sensiva in Method B.

The Snedecor F test was applied to see if there were significant differences between method A and method B. For TEC and Farnesol determination no significant differences were observed between methods, contrary to what was found in the determination of TEC and Sensiva.

Finally, it was possible to conclude that the product was compliant since the percentages of TEC, Sensiva and Farnesol obtained were within the range of specified values.

**Keywords:** Gas Chromatography, Triethyl Citrate, Ethylhexylglycerine, Farnesol, Repeatability, Intermediate Precision, Methods comparison



# Índice

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....                                      | iii  |
| Sumário .....   | v    |
| Abstract .....  | vii  |
| Índice de figuras .....                                   | xi   |
| Índice de tabelas.....                                    | xiii |
| Siglas.....   | xv   |
| Acrónimos.....  | xv   |
| Símbolos.....   | xv   |
| 1. Introdução.....  | 1    |
| 1.1. A empresa.....                                       | 1    |
| 1.1.1. Unidade de Enchimento e Departamento Técnico ..... | 4    |
| 1.2. Objetivos e organização da dissertação .....         | 5    |
| 1.2.1. Objetivo .....                                     | 5    |
| 1.2.2. Organização da dissertação.....                    | 5    |
| 2. Aerossol .....   | 7    |
| 2.1. Processos de Enchimento.....                         | 9    |
| 3. Princípios Ativos .....                                | 11   |
| 3.1. Trietil Citrato.....                                 | 11   |
| 3.2. Etilhexilglicerina.....                              | 12   |
| 3.3. Farnesol .....                                       | 13   |
| 4. Cromatografia Gasosa.....                              | 15   |
| 5. Validação de métodos analíticos .....                  | 19   |
| 5.1. Quantificação .....                                  | 20   |
| 5.2. Especificidade/Seletividade.....                     | 21   |
| 5.3. Precisão .....                                       | 21   |
| 5.3.1. Repetibilidade .....                               | 21   |
| 5.3.2. Precisão Intermédia .....                          | 22   |
| 5.3.3. Reprodutibilidade .....                            | 22   |
| 5.4. Robustez.....  | 23   |
| 5.5. Exatidão .....                                       | 23   |
| 6. Procedimento Experimental.....                         | 25   |
| 6.1. Material, equipamento e reagentes .....              | 25   |
| 6.2. Preparação das soluções padrão e amostra .....       | 25   |
| 6.2.1. Método A .....                                     | 25   |
| 6.2.2. Método B .....                                     | 26   |

|  |    |
|--|----|
| 6.3. Procedimento de análise .....   | 26 |
| 6.4. Expressões de cálculo.....  | 27 |
| 6.5. Condições Cromatográficas .....   | 29 |
| 7. Resultados e Discussão .....  | 31 |
| 7.1. Repetibilidade.....   | 31 |
| 7.1.1. Determinação de TEC e Sensiva em DEO's .....                            | 31 |
| 7.1.2. Determinação de TEC e Sensiva em APD's .....                            | 34 |
| 7.1.3. Determinação de TEC e Farnesol em DEO's .....                           | 35 |
| 7.2. Precisão Intermédia .....   | 39 |
| 7.3. Comparação entre os dois métodos .....                                    | 40 |
| 7.4. Especificações .....  | 41 |
| 8. Trabalho complementar desenvolvido na empresa.....                          | 43 |
| 9. Conclusões e considerações finais .....                                     | 45 |
| Referências .....  | 47 |
| Anexos .....   | 51 |
| Anexo A. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's.....     | 51 |
| Anexo B. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em APD's. ....    | 53 |
| Anexo C. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's. ....   | 54 |
| Anexo D. Distribuição F de Snedecor com grau de significância de 5% [48]. .... | 56 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1. Logotipo atual da empresa[1].....   | 2  |
| Figura 1.2. Visão global das diferentes fábricas da Colep[1].....   | 2  |
| Figura 1.3. Fluxograma geral do processo produtivo da Colep [6] .....   | 3  |
| Figura 1.4. Organograma do Departamento Técnico (Adaptado de [7]) .....   | 4  |
| Figura 2.1. Tipos de material utilizados em embalagens de aerossóis (Adaptado de [11]). .....   | 7  |
| Figura 2.2. Esquema do funcionamento de um aerossol (Adaptado de [11]). .....   | 8  |
| Figura 2.3. Diferentes perspectivas de uma válvula de um aerossol (Adaptado de [11,14]) .....   | 9  |
| Figura 2.4. Processo de enchimento de aerossol BoV: a) Introdução da válvula com o saco na lata b) Cravação da válvula c) Introdução do produto juntamente com isobutano e isopentano d) Limpeza da válvula (Adaptado de [11]). ..... | 10 |
| Figura 3.1. Estrutura química do Trietil Citrato[17]. .....   | 11 |
| Figura 3.2. Estrutura química da Etilhexilglicerina[21]......   | 12 |
| Figura 3.3. Estrutura química do Farnesol[25]. .....  | 13 |
| Figura 4.1. Esquema da cromatografia gasosa (Adaptado de [24]).....   | 15 |
| Figura 4.2. Cromatograma de uma mistura separada por GC (Adaptado de [21]). .....   | 16 |
| Figura 5.1. Parâmetros a avaliar numa validação[41]. .....  | 19 |
| Figura 6.1. Síntese da análise efetuada.....  | 26 |
| Figura 7.1. Cromatograma relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método A pelo operador 1.....  | 32 |
| Figura 7.2. Cromatograma relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método A pelo operador 2.....  | 33 |
| Figura 7.3. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método B pelo operador 1.....   | 34 |
| Figura 7.4. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método B pelo operador 2.....   | 34 |
| Figura 7.5. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método A pelo operador 1 .....   | 37 |
| Figura 7.6. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método A pelo operador 2 .....   | 37 |
| Figura 7.7. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método B pelo operador 1.....  | 38 |

Figura 7.8. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método B pelo operador 2..... 38

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 6.1. Condições cromatográficas relativas ao método A.....  | 29 |
| Tabela 6.2. Condições cromatográficas relativas ao método B.....  | 30 |
| Tabela 7.1. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's. ....                    | 31 |
| Tabela 7.2. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva.....                              | 35 |
| Tabela 7.3. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's .....                   | 36 |
| Tabela 7.4. Precisão intermédia obtida na determinação de TEC e Sensiva. ....                                 | 39 |
| Tabela 7.5. Precisão intermédia obtida na determinação de TEC e Farnesol. ....                                | 39 |
| Tabela 7.6. Resultados obtidos relativamente ao Teste Fisher-Snedecor na determinação de TEC e Sensiva. ....  | 40 |
| Tabela 7.7. Resultados obtidos relativamente ao Teste Fisher-Snedecor na determinação de TEC e Farnesol. .... | 40 |
| Tabela 7.8. Comparação entre os valores especificados e os valores obtidos.....                               | 41 |



## Siglas

|     |   |
|-----|---|
| APD | Antitranspirante ( <i>Anti Perspirant Deodorant</i> ) |
| DBP | Di-n-butil ftalato                                    |
| DT  | Departamento Técnico                                  |
| EHG | Etilhexilglicerina                                    |
| GC  | Cromatografia Gasosa                                  |
| MRC | Materiais de Referência Certificados                  |

## Acrónimos

|     |                                    |
|-----|------------------------------------|
| BoV | <i>Bag on Valve</i>                |
| DEO | Desodorizante ( <i>Deodorant</i> ) |
| FID | Detetor de Ionização de Chama      |
| LOD | Limite de Deteção                  |
| LOQ | Limite de Quantificação            |
| TEC | Trietil Citrato                    |

## Símbolos

|            |  |
|------------|--|
| $CV_i$     | Coeficiente de Variação da precisão intermédia |
| $CV_r$     | Coeficiente de Variação de repetibilidade      |
| $r$        | Limite de Repetibilidade                       |
| $S_A^2$    | Variância relativa ao Método A                 |
| $S_B^2$    | Variância relativa ao Método B                 |
| $S_i$      | Desvio-padrão da precisão intermédia           |
| $S_i^2$    | Variância da precisão intermédia               |
| $S_r$      | Desvio-padrão da repetibilidade                |
| $t_R$      | Tempo de Retenção                              |
| $\sigma^2$ | Variância da banda cromatográfica              |



# 1. Introdução

O presente trabalho foi realizado no âmbito da unidade curricular de “Dissertação/Estágio” do Mestrado em Engenharia Química, no ramo de especialização de Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto. O estágio em questão realizou-se na empresa Colep, em Vale de Cambra, no Departamento Técnico inserido na unidade de Enchimento e teve duração de 6 meses. Apresenta como objetivo a análise da precisão, nomeadamente da repetibilidade e precisão intermédia, e a comparação entre métodos, na determinação de Trietil Citrato (TEC), Etilhexilglicerina (Sensiva) e Farnesol em desodorizantes (DEO's) e antitranspirantes (APD's).

## 1.1. A empresa

A Colep, situada em Vale de Cambra, é uma das empresas do grupo RAR, sendo líder mundial de embalagens de bens de consumo e *contract manufacturing*, na fabricação de aerossóis e líquidos e um importante fornecedor de embalagens de folha de flandres e plástico[1].

Fundada em 1965 pelo empresário Ilídio Pinho, a Colep tem vindo a crescer ao longo dos anos, com presença em Portugal, Alemanha, Polónia, Espanha, Reino Unido, Brasil, México e no Médio Oriente.

Em 1975, a Colep iniciou-se na *Contract Manufacturing*, ou seja, na formulação, fabrico, enchimento e embalamento de produtos de grande consumo em embalagens metálicas e plásticas. Essencialmente, fornece um serviço completo aos seus clientes[2]. Em 1993, procedeu à compra da fábrica da S. C. Johnson's em Espanha fundando a Colep Espanha. Em 1999, a Colep adquiriu a CENSA que se tornou a Colep Navarra, dedicada à produção de embalagens em folha-de-flandres. Para além desta expansão, no mesmo ano, a Colep também comprou a *Shirley & Associates*, no Reino Unido, dedicando-se à *Contract Operations*.

Já em 2001, foi realizado o primeiro grande investimento de raiz a nível internacional, na Polónia, destinado ao *Contract Manufacturing*. No mesmo ano, a Colep passou a pertencer ao Grupo RAR.

Em 2004, fundiu-se às divisões europeias de *Custom Manufacturing* da CCL Industries Inc., formando a COLEPCCL, nome esse que, em 2011, alterou para Colep permanecendo até hoje (Figura 1.1). Entretanto, a Colep também se estabeleceu no Brasil.



Figura 1.1. Logotipo atual da empresa[1].

Em 2013, a Colep estabeleceu uma aliança com a *One Asia Network* liderando o mercado asiático na produção de aerossóis e de componentes líquidos. No mesmo ano, a Colep também se expandiu, não só para o México, como também para os Emirados Árabes Unidos.

Já em 2016 adquiriu mais uma fábrica na Polónia, em Kleszczów. A Colep fechou esse ano com vendas consolidadas de 464 milhões de euros[3].

A Figura 1.2 apresenta uma visão a nível mundial das diferentes fábricas da Colep.

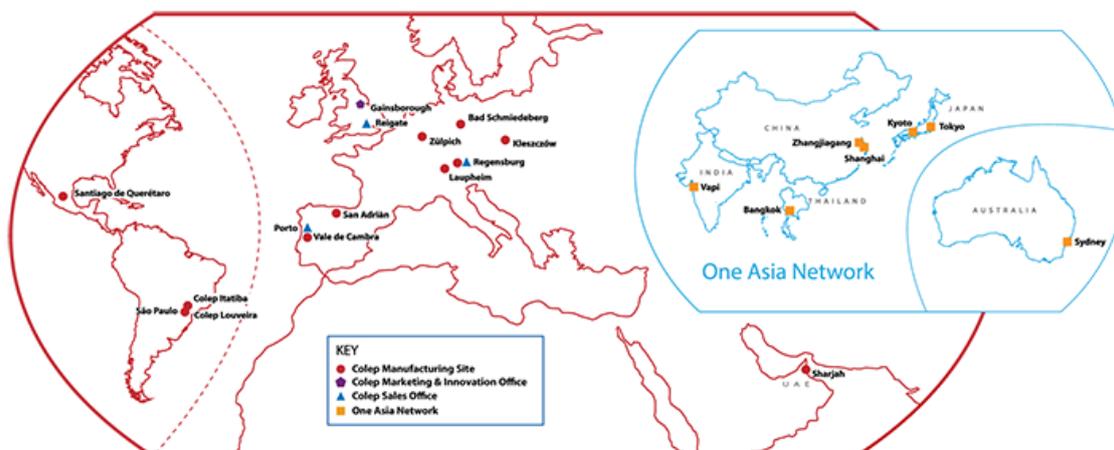


Figura 1.2. Visão global das diferentes fábricas da Colep[1]

A Colep destaca-se através dos valores que procura seguir e transmitir, entre os quais [4]:

- Foco no cliente procurando alcançar e exceder as expectativas dos clientes tanto externos como internos;
- Ética, procurando atuar sempre com respeito e confiança;
- Aprendizagem e criatividade, procurando criatividade na procura de novas soluções com aplicação prática;

- Criação de valor, comprometendo-se com uma criação sustentável de valor para a empresa e para todas as partes interessadas;
- Paixão pela excelência, esforçando-se por melhorar continuamente e alcançar a excelência em todo o seu trabalho.

A Colep é responsável pelo enchimento de aerossóis e líquidos (*product supply group division*), pela Litografia e pela produção de embalagens metálicas e plásticas (*packaging division*), cujo processo produtivo está descrito na Figura 1.3. Na unidade de enchimento, a fábrica é composta por duas grandes áreas distintas: a área dedicada a produtos cosméticos entre os quais desodorizantes, espumas e géis de barba, e a área dedicada a produtos de não cosmética como inseticidas, produtos de limpeza, entre outros[5].

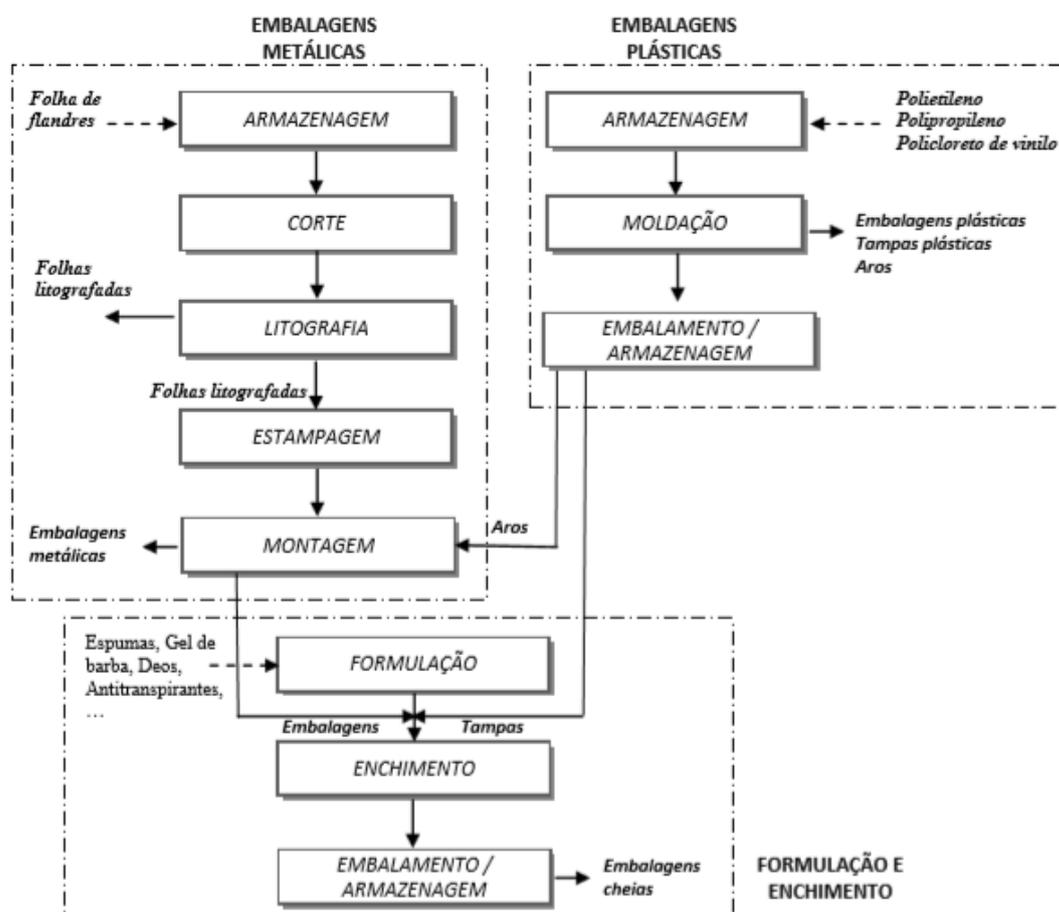


Figura 1.3. Fluxograma geral do processo produtivo da Colep [6]

### 1.1.1. Unidade de Enchimento e Departamento Técnico

Esta dissertação foi inserida no Departamento Técnico (DT) da Unidade de Enchimento da Colep. Para além do enchimento do produto, esta unidade é responsável pela formulação química e embalagem do mesmo. Abrange produtos como desodorizantes, antitranspirantes, espumas de barbear, loções corporais, produtos de limpeza, lubrificantes, entre outros.

O DT, tal como o próprio nome indica, auxilia na preparação/desenvolvimento técnico inerente ao produto final atuando na cotação, desenvolvimento e qualidade do mesmo. É responsável por toda a documentação técnica, análise de matérias-primas, desenvolvimento de métodos analíticos, métodos de trabalho ou de equipamentos, desenvolvimento/validação do *blending* (formulação), limpeza/sanitização e primeiras produções. O organograma relativo ao DT encontra-se representado na Figura 1.4.

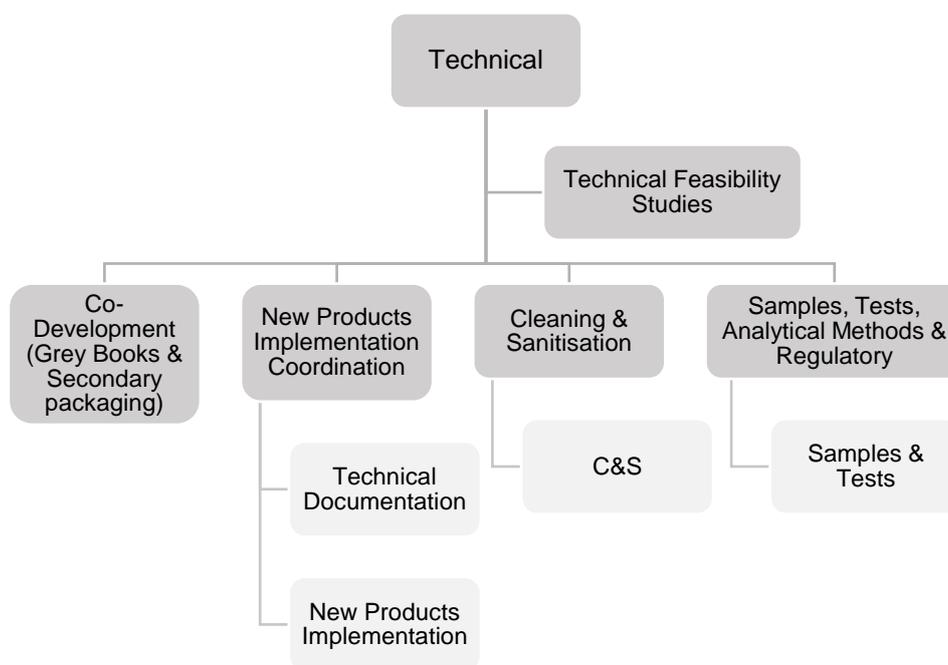


Figura 1.4. Organograma do Departamento Técnico (Adaptado de [7])

O DT possui um laboratório que colabora com a produção uma vez que apresenta equipamentos semelhantes a esta, mas em pequena escala. Isso torna-se útil na realização de ensaios solicitados por clientes.

Tal como foi referido anteriormente, a Colep está inserida na indústria de embalagens e *contract manufacturing* (formulação química do produto, fabrico, enchimento e embalagem de produtos de grande consumo)[8]. Por conseguinte, o objetivo fulcral é satisfazer o cliente que envia toda a informação de acordo com o que

pretende. Deste modo, será necessário adequar essa informação ao pessoal e aos equipamentos disponibilizados na empresa.

## **1.2. Objetivo e organização da dissertação**

### **1.2.1. Objetivo**

Com a presente dissertação, pretendeu-se verificar a precisão, nomeadamente a repetibilidade e precisão intermédia, de dois métodos utilizados para determinar a presença de substâncias ativas presentes em DEO's e APD's e, ainda, efetuar a comparação entre esses mesmos métodos. O Método A, método fornecido por um cliente, prevalece sobre qualquer método e, uma vez que este já se encontra validado, apenas foi necessário efetuar análise da precisão, nomeadamente da repetibilidade e precisão intermédia. Já o Método B, método desenvolvido pela empresa, é um método que apenas é utilizado como confirmação ou em caso de dúvida, e embora ainda necessite de ser validado, como não é uma prioridade, também foi realizada a mesma análise. Isto deveu-se ao facto de terem existido alterações no procedimento experimental de ambos de forma a otimizar o mesmo.

Os valores obtidos através destes métodos devem estar dentro de intervalos de especificações fornecidos pelo cliente verificando-se se os produtos estavam ou não conformes relativamente a este parâmetro.

### **1.2.2. Organização da dissertação**

A presente dissertação está dividida em 9 capítulos. No primeiro capítulo, encontra-se a apresentação da empresa e da unidade onde o estágio foi realizado. É ainda realçado o porquê da análise de apenas da precisão, nomeadamente da repetibilidade e precisão intermédia.

No segundo capítulo são explicados os princípios gerais de um aerossol assim como os seus processos de enchimento.

Os três princípios ativos analisados neste trabalho são apresentados no terceiro capítulo nomeadamente a sua descrição e propriedades.

No quarto capítulo é descrita a técnica utilizada na determinação dos princípios ativos, a Cromatografia Gasosa, dando ênfase ao detetor por ionização de chama tendo em conta que foi o detetor utilizado na empresa.

A validação de métodos analíticos e os respetivos parâmetros analisados são apresentados no quinto capítulo.

O sexto capítulo diz respeito à descrição do procedimento experimental.

No sétimo capítulo são apresentados os resultados obtidos e a respetiva discussão.

O oitavo capítulo descreve o trabalho complementar desenvolvido na empresa.

Por fim, no nono capítulo são referidas as conclusões do trabalho realizado e algumas considerações finais.

## 2. Aerossol

Tal como referido no subcapítulo 1.1, a empresa é responsável pelo enchimento de produtos líquidos e aerossóis. Os produtos em análise, os DEO's e APD's, apresentam-se na forma de aerossol.

Embora os aerossóis surgissem no mercado nos anos 30 do século XX, apenas durante a Segunda Guerra Mundial é que se observou uma expansão significativa pela utilização de inseticidas na guerra. A partir daí, expandiram-se em cosméticos sendo os mais populares as lacas para o cabelo e as espumas de barbear seguidos pelos desodorizantes e antitranspirantes[9].

Um aerossol é uma suspensão coloidal em que partículas finas de um sólido ou líquido estão contidas no ar ou num outro gás[9]. Segundo a Diretiva (75/324/CEE) relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes às embalagens aerossóis “entende-se por embalagem aerossol o conjunto constituído por um recipiente não reutilizável de metal, vidro ou plástico, contendo um gás comprimido, liquefeito ou dissolvido sob pressão, com ou sem líquido, pasta ou pó e provido de uma válvula que permite a saída do conteúdo sob a forma de partículas sólidas ou líquidas em suspensão num gás, ou sob a forma de espuma, de pasta ou de pó, ou no estado líquido”[10].

A embalagem de um aerossol pode ser de metal, plástico ou vidro (Figura 2.1). Esta apresenta ainda a válvula, atuador, produto e propulsor.

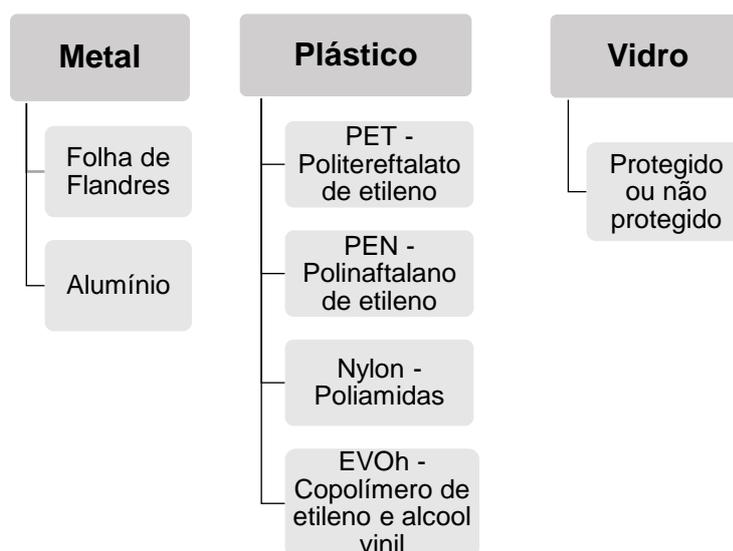


Figura 2.1. Tipos de material utilizados em embalagens de aerossóis (Adaptado de [11]).

Como é possível verificar na Figura 2.2, quando o atuador é pressionado, o gás propulsor é comprimido, expande e o produto é empurrado para baixo. Este entra no tubo imerso e sai pela válvula que se encontra aberta. Como a pressão no exterior é inferior à pressão no interior do aerossol, o propulsor volta ao estado gasoso libertando assim o produto na forma de uma névoa. Quando se trata de uma mousse ou espuma, o propulsor cria bolhas que faz com que o produto se expanda[11,12].

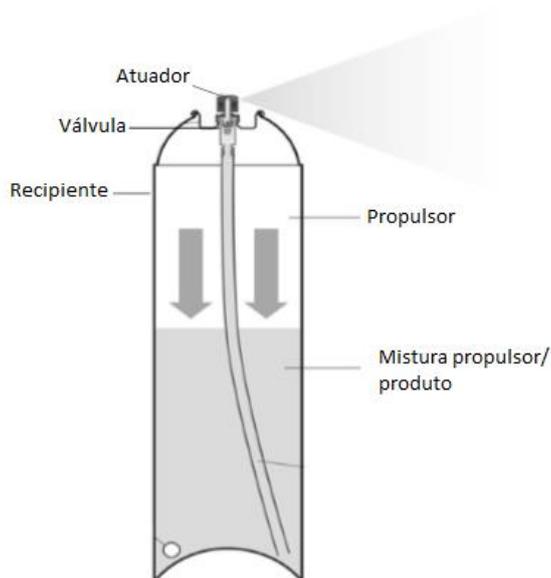


Figura 2.2. Esquema do funcionamento de um aerossol (Adaptado de [11]).

Um dos constituintes do aerossol bastante importante é a válvula que, tal como demonstra a Figura 2.3, é constituída pela *valve cup* ou cúpula, *mounting cup gasket* ou junta externa, *stem gasket* ou junta interna, *stem*, *spring* ou mola, *housing* e pelo *dip tube*. A cúpula é composta por folha de flandres ou alumínio sendo a peça que suporta o conjunto da válvula. A junta externa assegura a proteção entre a válvula e o recipiente. O *stem* controla a quantidade de produto que sai e é onde a mola se situa sendo que esta garante o funcionamento da válvula. O *housing* permite a junção dos constituintes da válvula e o *dip tube*, composto por polietileno ou polipropileno, é por onde o produto é conduzido em direção à válvula para ser expelido[13].

Existe ainda o aerossol BoV (*Bag on Valve*) que foi desenvolvido em 1982. Este tipo de aerossol apresenta um saco soldado à válvula em que é rodeado pelo gás propulsor, geralmente azoto. Quando o atuador é pressionado, o gás faz pressão no saco que se encontra cheio, fazendo com que haja força suficiente para que o produto seja libertado. O gás permanece no interior não saindo para a atmosfera.

O saco é feito de quatro materiais, polipropileno no interior, nylon, alumínio, politereftalato de etileno no exterior e é ligado ao *housing* da válvula por calor.

Este tipo de aerossol permite que seja dispensado 100% de produto, que o aerossol seja atuado em qualquer posição e é menos suscetível a contaminações. Para além disso, este tipo de aerossol é reciclável resultando numa pegada ecológica menor[14].

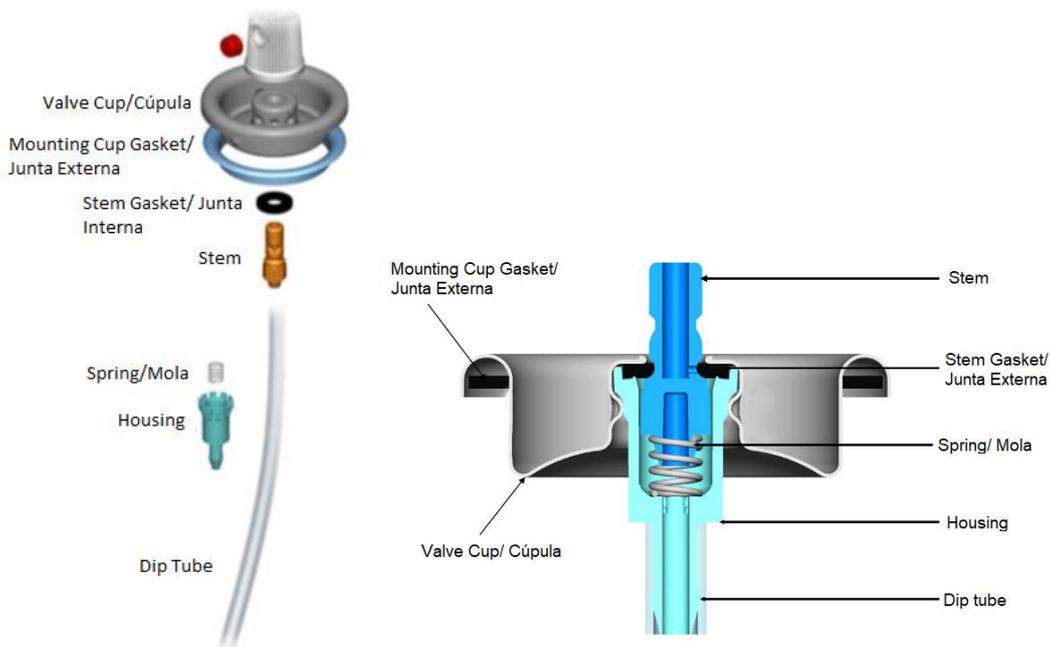


Figura 2.3. Diferentes perspectivas de uma válvula de um aerossol (Adaptado de [11,14])

## 2.1. Processos de Enchimento

Relativamente ao processo de enchimento de aerossóis, este começa pela introdução do produto na lata obedecendo aos volumes estipulados, seguindo a cravação da válvula. É necessário verificar se a mesma se encontra bem cravada, havendo monitorização de forma a verificar os parâmetros de cravação (altura e diâmetro). O gás é introduzido, num compartimento isolado no exterior e os aerossóis passam num banho entre 55 e 60 °C de modo a detetar fugas controlando o processo de cravação e a resistência do produto a variações de pressão no interior. Caso existam fugas, as latas são imediatamente rejeitadas. Neste banho é igualmente controlada a quantidade de nitritos visto que, caso se trate de aerossóis em folha de flandres, estes podem oxidar. De seguida, são colocados o atuador e a tampa ou tampa/atuador dependendo do produto que se trate. Por último, o aerossol é codificado com a informação fornecida pelo cliente e, com as especificações finais de embalagem também disponibilizadas pelo cliente, está pronto para envio.

Todavia, este processo de enchimento pode variar, por exemplo, quando se trata de um aerossol BoV. Neste tipo de aerossol, como referido anteriormente, a válvula contém um saco soldado (Figura 2.4). Este conjunto é introduzido na lata (a) assim como o gás (azoto) no espaço entre o saco e a lata ao mesmo tempo que ocorre a cravação da válvula (b). Depois de verificada a pressão no interior do saco e da remoção de qualquer resíduo que possa estar presente no saco, o produto juntamente com isopentano e isobutano (previamente misturados) é colocado no interior do saco através do *stem* (c). Por fim, o aerossol passa por um chuveiro de forma a retirar o excesso de produto (d), é pesado e encaminhado para o banho para verificar se existem fugas. Colocados o atuador e tampa ou atuador/tampa, segue, de igual forma, para a codificação e envio.

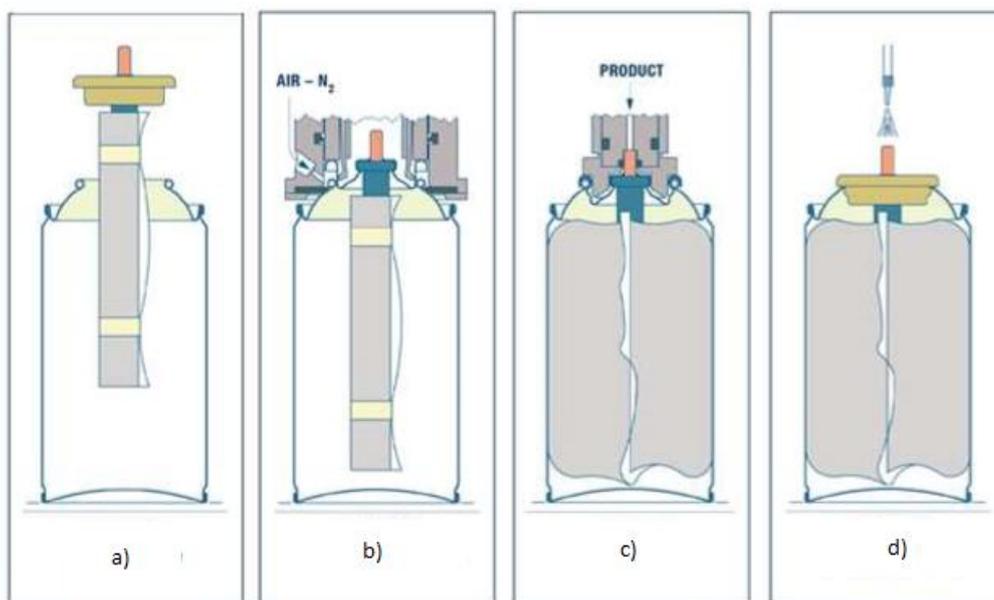


Figura 2.4. Processo de enchimento de aerossol BoV: a) Introdução da válvula com o saco na lata b) Cravação da válvula c) Introdução do produto juntamente com isobutano e isopentano d) Limpeza da válvula (Adaptado de [11]).

### 3. Princípios Ativos

De acordo com a finalidade do produto e do mercado alvo que se pretende atingir, são introduzidos diferentes tipos de princípios ativos em formulações. Por exemplo, os produtos diferem de acordo com o setor, feminino ou masculino, a que são destinados, não só relativamente ao perfume, mas também a nível de cuidado de pele, entre outros. Neste grupo de produtos, inserem-se os DEO's e APD's que pretendem combater o mau odor e a transpiração. Estes produtos começaram a estar disponíveis a partir de cerca de 1800 e hoje fazem parte do quotidiano[15]. A principal diferença entre ambos, é que o APD tem como objetivo inibir a produção da transpiração enquanto que o DEO não impede de transpirar, mas elimina as bactérias causadoras de mau odor, camuflando-o.

O Trietil Citrato (TEC), Etilhexilglicerina (EHG) e Farnesol são três exemplos de princípios ativos utilizados nas formulações de DEO's e APD's.

#### 3.1. Trietil Citrato

TEC é um éster de ácido cítrico que pertence à família dos ácidos Tricarboxílicos e derivados[16] e a sua fórmula está presente na Figura 3.1. É formado através da esterificação do etanol com ácido cítrico e posterior purificação, não necessitando de qualquer outro tratamento para a sua utilização em produtos cosméticos[17]. É um líquido incolor e inodoro.

Foi aprovado para uso farmacêutico e alimentar há 50 anos sendo utilizado igualmente em produtos cosméticos uma vez que possui propriedades desodorizantes e de cuidado de pele excelentes. A sua fórmula molecular é  $C_{12}H_{20}O_7$  e possui massa molar de  $276,28 \text{ g.mol}^{-1}$  [17].

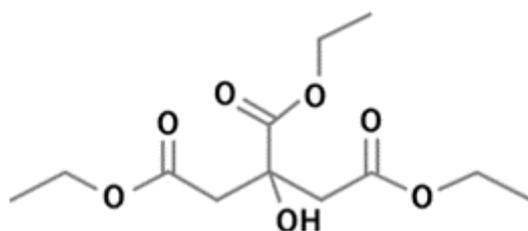


Figura 3.1. Estrutura química do Trietil Citrato[17].

O TEC é visto como um aditivo seguro e suave sendo utilizado em desodorizantes uma vez que não interfere com os processos naturais da pele mesmo

em casos de uso em excesso e apresenta uma boa interação com outros compostos aquando da formulação. É de elevado interesse uma vez que inibe a decomposição enzimática dos componentes do suor apresentando ainda propriedades antimicrobianas [17]. O seu mecanismo de ação é dependente do valor do pH. Isto porque a redução do pH da pele vai reduzir reversivelmente a atividade das enzimas esterases presentes na superfície da pele, inibindo a formação de compostos formadores de odor[18,19].

### 3.2. Etilhexilglicerina

EHG, cuja estrutura química está presente na Figura 3.2, foi introduzida no mercado da cosmética em 1992, conhecido como Sensiva® SC 50. É um líquido incolor e praticamente inodoro, utilizado como aditivo em cuidados de pele e desodorizantes tratando-se de um composto com um elevado teor de pureza. É frequentemente utilizado como uma alternativa a parabenos, sendo considerado um “conservante-like” ou “conservante não listado”. Isto porque apresenta o mesmo objetivo que os conservantes, mas, ao contrário destes, participa na eficácia da fórmula[20].

É um aditivo multifuncional e versátil utilizado atualmente na área da cosmética devido às suas propriedades surfactantes, antimicrobianas e emolientes para além do facto de ser um eficaz princípio ativo em desodorizantes.[21]. Este aditivo auxilia na formulação de cosméticos uma vez que a sua estabilidade química permite que seja compatível com outros princípios ativos e inibe o crescimento e desenvolvimento das bactérias causadoras de odores, bactérias Gram positivas, sem prejudicar a pele[22].

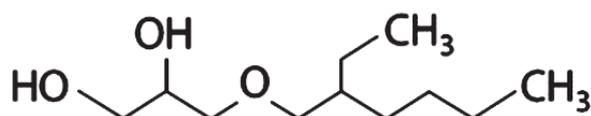


Figura 3.2. Estrutura química da Etilhexilglicerina[21].

A EHG é um éter alquil-glicérfico, ou seja, o grupo etilhexil está ligado à glicerina por uma ligação éter. Apresenta como fórmula empírica  $C_{11}H_{24}O_3$  e uma massa molecular de  $204,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]. Relativamente à sua solubilidade, este é pouco solúvel em água, mas bastante solúvel em álcoois, glicóis e óleos[24]. Apresenta um coeficiente de dispersão de  $700 \text{ mm}^2/10 \text{ min}$ , sendo considerado um emoliente médio uma vez que promove uma sensação de pele macia e suave durante mais tempo, propriedade bastante importante num produto cosmético[23].

Este composto é capaz de aumentar a velocidade de absorção, diminuir a oleosidade e a sensação de creme “pegajoso” melhorando a formulação do produto

visto que consegue compensar algumas desvantagens de emulsões que contenham glicerina. Isto porque, sendo a glicerina o hidratante mais utilizado em cosmética, uma alta concentração da mesma pode levar à penetração lenta do creme na pele, por exemplo, quando aplicada em cremes e loções[23].

### 3.3. Farnesol

O Farnesol é um álcool sesquiterpeno (derivado de três unidades de isoprenos que existe em várias formas), um ingrediente natural com alto poder biológico resultante de óleos essenciais cuja estrutura química se encontra na Figura 3.3. Embora o Farnesol natural possa ser retirado de óleos, o seu rendimento seria apenas de 2-3%. Assim, o Farnesol é obtido através do nerolidol por isomerização sobre um catalisador de vanádio. É um líquido incolor que possui um odor delicado e floral e é hidrofóbico, sendo insolúvel em água, mas miscível com óleos. Apresenta  $C_{15}H_{26}O$  como fórmula química e um peso molecular de  $222,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [25].

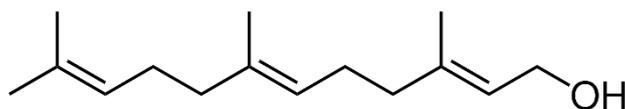


Figura 3.3. Estrutura química do Farnesol[25].

Em cosméticos, este é empregue na formulação de produtos já que possui características que tornam a pele mais suave e firme. Graças ao seu aroma, melhora o perfume do produto realçando os seus componentes. Apresenta ainda atividade antimicrobiana[26]. No entanto, apresenta um elevado potencial alergénico pelo que a quantidade colocada de Farnesol em produtos cosméticos é bastante controlada segundo o Regulamento número 1223/2009 apresentando-se na lista de substâncias que os produtos cosméticos não podem conter fora das restrições previstas[27].



## 4. Cromatografia Gasosa

De todas as técnicas cromatográficas utilizadas para fins analíticos, a cromatografia gasosa (GC) é a técnica mais amplamente empregue nas mais diversas áreas uma vez que oferece uma elevada capacidade de separação e sensibilidade para a análise de compostos voláteis[28].

Na técnica em questão, ocorre a separação de substâncias voláteis que são arrastadas por uma fase móvel através de uma fase estacionária[12]. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, na cromatografia gasosa a fase móvel não interage com o analito conduzindo-o apenas através da coluna[29].

Nesta técnica, a fase móvel é fornecida à entrada do equipamento, fluindo através da coluna até chegar ao detetor. A amostra é injetada através de uma seringa que perfura o septo, onde aquece até volatilizar havendo, desta forma, a separação dos seus componentes na coluna. Esta separação ocorre devido à interação entre os componentes da amostra e a fase estacionária por partição diferencial com base na pressão de vapor relativa e na solubilidade na fase estacionária líquida imobilizada. A separação ocorre por taxas de migração diferentes dos compostos por diferentes interações com a fase estacionária. De seguida, os componentes irão passar por um sistema de deteção. A informação passa por um sistema de dados adequado de modo a obter os resultados finais (Figura 4.1) [30].

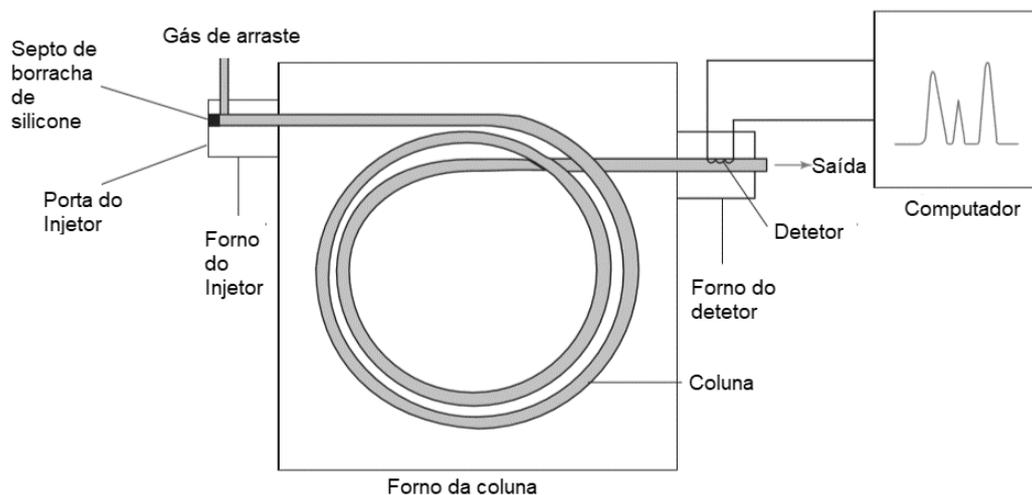


Figura 4.1. Esquema da cromatografia gasosa (Adaptado de [24])

A resposta final aparece sob a forma de um cromatograma que exhibe a resposta do detetores em função do tempo de eluição (Figura 4.2). Nesta figura apresenta-se o cromatograma obtido para uma mistura de dois componentes. O tempo de retenção,  $t_R$ , é o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do componente

no detector. O tempo morto,  $t_M$ , é o tempo necessário para que um soluto não retido passe através da coluna cromatográfica. O tempo de retenção ajustado para um analito retido,  $t_S$ , é o tempo adicional necessário para passar por todo o comprimento da coluna (tempo de permanência do analito na fase estacionária), ou seja[28,31]:

$$t_S = t_R - t_M \quad (4.1)$$

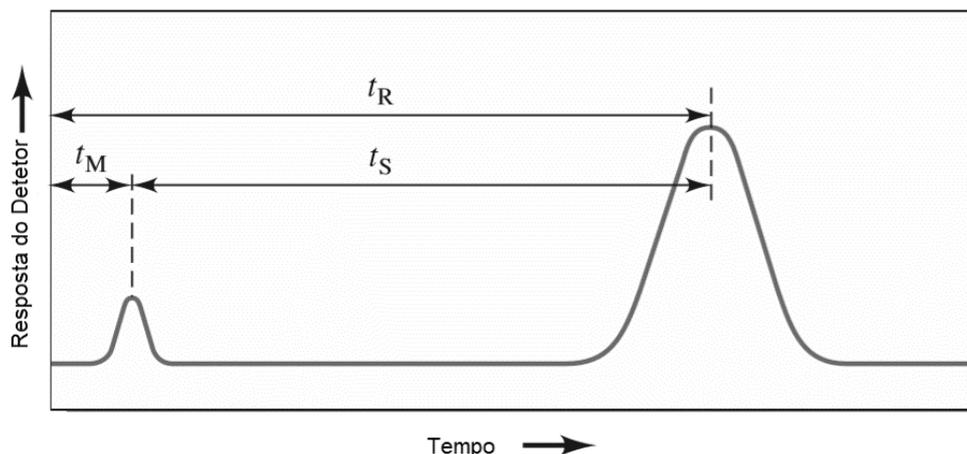


Figura 4.2. Cromatograma de uma mistura separada por GC (Adaptado de [21]).

Caso de obtenha uma separação eficaz, cada pico corresponderá a um componente da mistura e a área do mesmo permite a quantificação do teor de analito na solução[32].

Os constituintes principais de um cromatógrafo gasoso são o sistema de gás, sistema de injeção, forno e coluna cromatográfica, sistema de detecção e de tratamento de dados[31].

A coluna cromatográfica é o constituinte mais importante e central do cromatógrafo onde ocorre a separação dos componentes da mistura. As colunas podem ser divididas em colunas empacotadas e capilares podendo variar entre 2 e 60 m ou mais de comprimento. O diâmetro da coluna e a espessura da fase estacionária são parâmetros importantes a ter em consideração. Colunas com uma espessura mais pequena fornecem uma alta resolução e separações mais rápidas, mas baixas capacidades de amostra. Já colunas com um diâmetro e espessura superiores fornecem uma maior capacidade de amostra, mas baixa resolução[31].

O detetor gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito presente. Essa resposta é amplificada e representada num cromatograma. O detetor mais frequente, e o utilizado neste trabalho, é o detetor por ionização de chama (FID) em que os compostos orgânicos que eluem da coluna são queimados através de uma chama de hidrogénio/ar. Quase todos os átomos de carbono são convertidos em  $\text{CH}_4$  e, posteriormente, oxidados a  $\text{CO}_2$  através de reações complexas. Durante este processo,

uma pequena fração de átomos de carbono é transformada em  $\text{CHO}^+$ , que gera uma pequena corrente elétrica entre dois elétrodos[30]. O íon  $\text{CHO}^+$  é responsável pelo sinal medido no FID. Sem a presença de  $\text{CH}$ , radicais de hidrocarbonetos e, finalmente,  $\text{CHO}^+$ , não há sinal no FID. Daí que, embora detete praticamente todos os compostos que contêm carbono, a resposta no FID é nula ou muito baixa num número reduzido de moléculas, como monóxido de carbono e dióxido de carbono [33].

Este detetor é o mais utilizado uma vez que apresenta uma elevada sensibilidade, elevado grau de linearidade, ótima estabilidade de linha de base (baixo ruído) e uma constante de tempo de resposta muito rápida[28].

O gás de arraste mais comum é o hélio sendo este compatível com a generalidade dos detetores. Para o FID, o  $\text{N}_2$  oferece um limite de deteção menor que o He[31]. Tanto o hidrogénio como o hélio fornecem um tempo de análise curto e uma temperatura de eluição baixa devido ao alto caudal e ao baixo peso molecular[34].

Todo o processo de separação ocorre no forno cromatográfico que controla a temperatura sendo capaz de produzir elevadas variações de temperatura. O sistema de ventilação permite que seja capaz de aquecer e arrefecer rapidamente. As ligações do injetor e do detetor também se encontram no interior do forno. Todas estas características permitem a existência de um controlo térmico bastante otimizado[30].

A GC apresenta várias vantagens relativamente a outras técnicas, entre as quais[35]:

- Análise rápida;
- Alta eficiência levando a uma alta resolução;
- Requer pequenas quantidades de amostra;
- Técnica de elevada confiança nos resultados.

Contudo, esta técnica está limitada a amostras voláteis e não é adequada a amostras que se degradam a elevadas temperaturas[29].

A GC é uma técnica bastante utilizada em cosméticos, pelo que existem frequentemente estudos nesta área. Por exemplo, um desses estudos debruçou-se na influência do envelhecimento da Sensiva, ou seja, se o tempo elevado de armazenamento influencia a qualidade desta matéria-prima. Através da GC, verificou-se que tal acontece, isto é, que o elevado tempo de armazenamento da Sensiva leva a que apareçam substâncias que se podem revelar perigosas principalmente quando se trata da área da cosmética em que poderá aumentar o risco de alergias ou outras doenças no cliente final[36].

Esta técnica ainda pode revelar-se útil na análise de substâncias que os produtos cosméticos não podem conter fora das restrições previstas, como o Farnesol.



## 5. Validação de métodos analíticos

Todo o laboratório deve garantir a qualidade e a confiança de qualquer método analítico e deste é esperado que se obtenha resultados consistentes, fiáveis e precisos. Desta forma, a validação ou a verificação de métodos é um processo de extrema importância uma vez que se torna necessário verificar se um método é capaz de responder aos requisitos pretendidos[38].

A validação é o ato de provar que qualquer abordagem, estratégia, procedimento experimental, processo, instrumentação e reagentes selecionados para o método irá funcionar devidamente segundo uma série de condições fixas[39].

Um método diz-se validado quando todos os requisitos são respeitados sendo que, para tal ser verificado, é necessário determinar vários critérios tais como quantificação, especificidade/seletividade, precisão, robustez e exatidão (Figura 5.1)[40]. Todavia, o laboratório pode escolher os parâmetros que pretende abranger no seu plano de validação, não sendo necessário determinar todos os parâmetros mencionados, tratando-se assim de uma validação parcial[32].

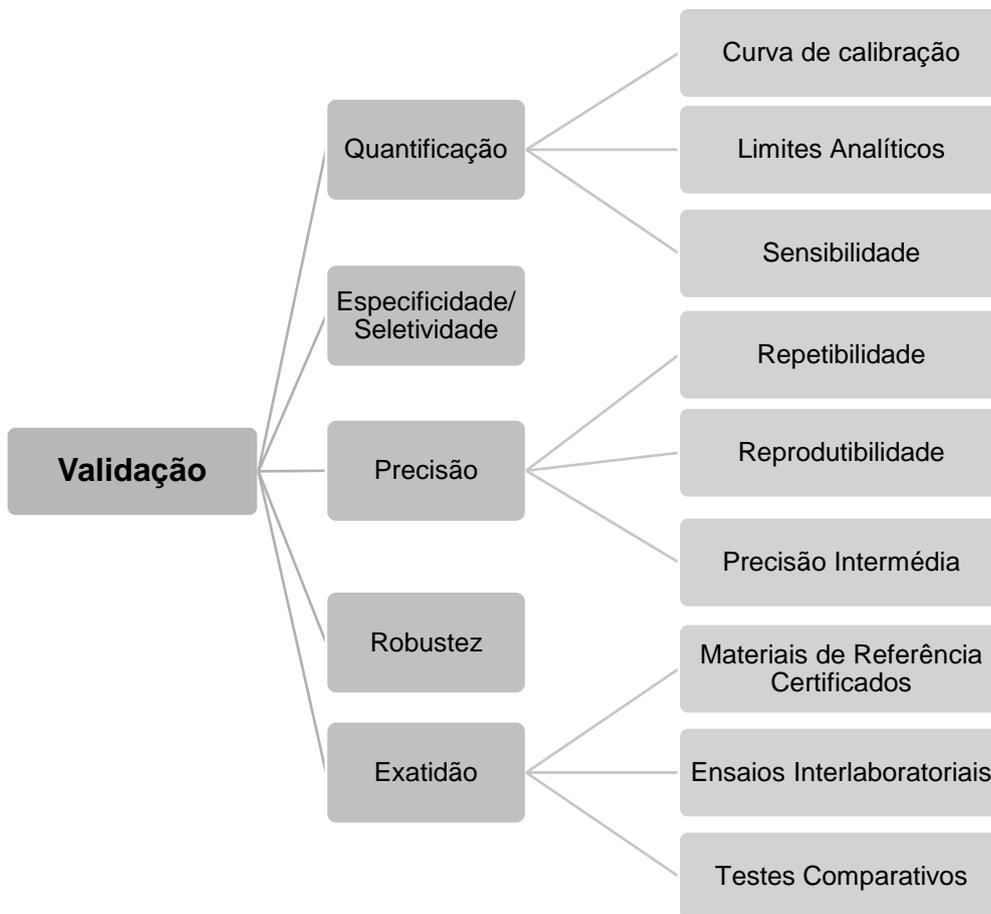


Figura 5.1. Parâmetros a avaliar numa validação[41].

## 5.1. Quantificação

De forma a interpretar todas as informações, são calculados vários parâmetros entre os quais se destacam a curva de calibração, limites analíticos e sensibilidade.

Em análises quantitativas, a calibração demonstra um processo em que a resposta de um sistema de medida se relaciona com a concentração ou quantidade de substância conhecida. Na prática, é preparada uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a analisar é conhecida. Estas soluções padrão são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições em que se mede a amostra e, por fim, é definido um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e é determinada a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação[40].

A curva de calibração ainda engloba a gama de trabalho e linearidade. Relativamente à gama de trabalho, esta corresponde ao intervalo de concentrações em que o analito pode ser determinado com uma boa linearidade, precisão e exatidão[32].

A linearidade de um método analítico diz respeito à capacidade, dentro de um determinado intervalo, de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra[41].

Em relação aos limites analíticos, tem-se o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) são extremamente importantes visto que permitem que se trace os limites analíticos do método a ser validado[32].

O limite de deteção é o teor mínimo a partir da qual é possível detetar a presença do analito, ou seja, é a quantidade mais baixa de analito na amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato[42]. Em termos quantitativos, pode ser calculado através da Equação 5.1:

$$LD = X_0 + 3.3\sigma_0 \quad (5.1)$$

sendo  $X_0$  a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e  $\sigma_0$  o desvio padrão associado a  $X_0$ . Toma-se o valor de 3.3 (constante da distribuição normal) para um nível de confiança de, aproximadamente, 99.7% se a lei de probabilidade de  $X_0$  é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gaussiana[40].

Relativamente ao limite de quantificação, este diz respeito à mais pequena quantidade de analito que é possível quantificar com uma determinada precisão e exatidão, isto é, corresponde ao padrão de calibração de menor calibração. Na prática, refere-se ao padrão de calibração de menor concentração. O coeficiente de variação

associado não deve ser superior a 10%, sendo este a razão entre o desvio padrão e a média dos valores encontrados[40].

Em termos quantitativos, pode ser calculado através da Equação 5.2:

$$LQ = X_0 + 10\sigma_0 \quad (5.2)$$

em que  $X_0$  a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e  $\sigma_0$  o desvio padrão associado a  $X_0$  [40].

## 5.2. Especificidade/Seletividade

Diz respeito à capacidade de outras substâncias interferirem com a identificação e/ou quantificação do analito, ou seja, é a capacidade do método de identificar o analito quando este se encontra na presença de outras substâncias[43]. O objetivo é distinguir e quantificar o analito mesmo quando este se encontra na presença de outras substâncias que poderão influenciar a resposta[42].

É possível afirmar que um método é específico quando este permite distinguir o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a averiguar, isto é, quando é garantido que a grandeza medida provém somente do analito[40].

## 5.3. Precisão

A precisão diz respeito à proximidade entre os resultados obtidos de vários ensaios de uma mesma amostra em condições definidas[40]. Este parâmetro pode ser considerado em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

### 5.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão nas mesmas condições experimentais num curto período de tempo, ou seja, ensaios realizados no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, com o mesmo equipamento, utilizando os mesmos reagentes e num curto período de tempo. A repetibilidade ainda pode ser determinada através de ensaios interlaboratoriais [32,42].

Quando se pretende determinar a repetibilidade de um método, efetuam-se várias medições ( $n \geq 10$ ) sobre a mesma amostra ou padrões, em condições de

repetibilidade, podendo ser expressa em desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) através da Equação 5.3:

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (5.3)$$

em que  $S_r$  é desvio padrão absoluto de repetibilidade e  $\bar{x}$  é a média dos valores considerados[44].

Relativamente ao limite de repetibilidade,  $r$ , este diz respeito valor abaixo do qual se deve situar com uma probabilidade específica, normalmente 95%, a diferença absoluta entre dois ensaios[45]. É obtido através de [40]:

$$r = 2,8 \sqrt{Sr^2} \quad (5.4)$$

### 5.3.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia representa a precisão nas mesmas condições experimentais em que os ensaios são realizados no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por operadores diferentes, com equipamentos diferentes e durante um longo período de tempo[46]. O propósito da determinação deste parâmetro é verificar que o laboratório é capaz de atingir os mesmos resultados mesmo quando a fase de validação termina[42]. A sua determinação pode ser realizada através de cartas de controlo de amplitudes ou através da Equação 5.5:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (5.5)$$

em que  $t$  diz respeito ao número de amostras ensaiadas, o  $n$  são o número de ensaios efetuados por amostra, o  $j$  é o número da amostra (que poderá ir de 1 a  $t$  amostras) e o  $k$  é o número do resultado obtido para a amostra  $j$  (que poderá ir de 1 a  $n$ )[40].

### 5.3.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade representa a precisão em diferentes condições experimentais, por exemplo, ensaios realizados em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, com equipamentos diferentes, utilizando reagentes diferentes e em intervalos de tempo diferentes[32].

A precisão é, usualmente, estimada através do desvio padrão ou do coeficiente de correlação. O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado através da Equação 5.6:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (5.6)$$

sendo  $S_{Li}^2$  a variância interlaboratorial e  $S_{ri}^2$  a variância de reprodutibilidade.

#### 5.4. Robustez

A robustez é a capacidade de o analito se manter inalterado quando submetido a pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método[47]. Conclui-se que um método é robusto quando este se revela insensível a pequenas variações dos parâmetros do método, ou seja, quanto maior o valor o valor da robustez, maior a confiança do método relativamente à robustez[32].

#### 5.5. Exatidão

A exatidão é vista como a concordância existente entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Este resultado pode ser avaliado através dos Materiais de Referência Certificados (MRC), Ensaio Interlaboratoriais e Testes comparativos[40].

Relativamente aos MRC, estes possuem um valor de uma determinada grandeza e uma incerteza associada. A aquisição de um MRC terá de ser feita a um fornecedor reconhecido e legítimo. O uso devido dos MRC consiste em recorrer à sua análise para avaliar o desempenho de um laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deverá, deste modo, ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a exatidão da análise. Se o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deverá investigar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las[40].

No que diz respeito aos ensaios interlaboratoriais, estes são utilizados quando se pretende estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos pelo laboratório e o valor dito como verdadeiro[40].

Já os testes comparativos pretendem estabelecer a relação que existe entre os resultados obtidos pelo método que se pretende avaliar e um método tido como referência. Isto leva a que se analise a exatidão do método interno face ao de referência[40].



## 6. Procedimento Experimental

### 6.1. Material, equipamento e reagentes

Na preparação das soluções amostra e padrão, as quantidades necessárias de TEC, Sensiva, Farnesol, Di-n-butil ftalato (DBP) e amostra foram pesadas na balança analítica Mettler Toledo, modelo AG204 Delta Tange e precisão de 0,1 mg. Foi ainda utilizada a unidade de ultrassons da marca Telsonic Ultrasonics. O material de vidro manuseado era de classe A.

A determinação de TEC, Sensiva e Farnesol foi realizada num cromatógrafo gasoso da marca Agilent da série 6890, com detetor FID, coluna capilar com dimensões 30,0 m x 320 µm x 0,25 µm e fase estacionária do tipo Metil Siloxano. O equipamento tinha o software *ChemStation A.10.02*.

O álcool isopropílico utilizado no Método A era da marca *WWR Chemicals* com pureza de 99,9%. Já o metanol utilizado no Método B era da marca *Fisher Chemicals* com pureza de 99,9%. Neste método, usou-se DBP 99% da marca *Acros Organics*.

Os princípios ativos TEC, Sensiva e Farnesol, sendo matérias-primas, são fornecidos por diferentes fornecedores.

A amostra a ser utilizada é o *bulk*, ou seja, o produto na primeira fase de formulação, sem o gás.

### 6.2. Preparação das soluções padrão e amostra

#### 6.2.1. Método A

##### Preparação da solução Padrão

Pesou-se, rigorosamente, 0,30 g de TEC e 0,20 g de Sensiva ou Farnesol. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,00 mL e perpez-se o volume com álcool isopropílico, agitando muito bem. Pipetou-se 5,00 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 50,00 mL, perpez-se o volume com álcool isopropílico e agitou-se vigorosamente.

##### Preparação da amostra

Pesou-se, rigorosamente, 2,00 g de amostra. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50,00 mL e adicionou-se álcool isopropílico até metade. Colocou-se nos ultrassons durante 5 minutos e perpez-se o volume com álcool isopropílico.

### 6.2.2. Método B

#### Preparação da solução padrão

Pesou-se, rigorosamente, 0,10 g de Sensiva ou Farnesol, 0,15 g de TEC e 0,10 g de DBP. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,00 mL e fez-se o volume com metanol, agitando bem.

#### Preparação da amostra

Pesou-se, rigorosamente, 0,10 g de DBP e 50,00 g de amostra. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,00 mL e fez-se o volume com metanol, agitando bem.

### 6.3. Procedimento de análise

Todas as determinações foram efetuadas por dois operadores distintos (1 e 2). Cada um realizou 10 injeções da solução amostra e 10 injeções da solução padrão (Figura 6.1), injetando 1  $\mu$ L de cada solução. Foram obtidos, desta forma, cromatogramas correspondentes à solução amostra e à solução padrão com os respectivos tempos de retenção e áreas dos picos. Apenas serão apresentados exemplos de cromatogramas relativos à solução amostra, uma vez que os cromatogramas correspondentes ao padrão são idênticos.

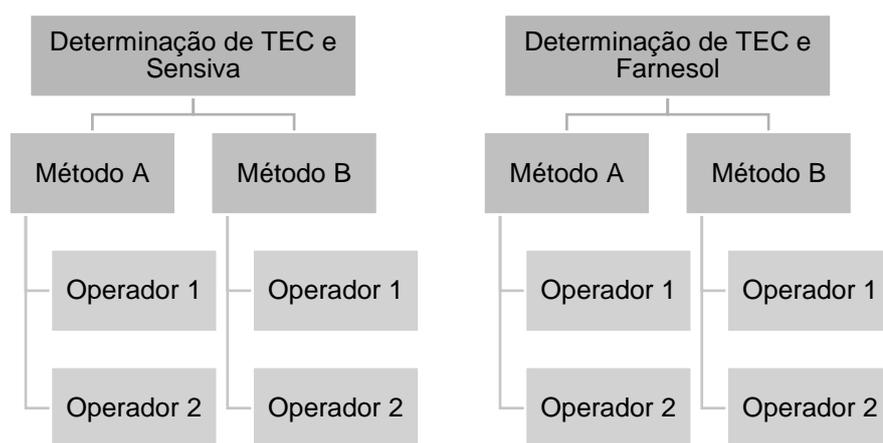


Figura 6.1. Síntese da análise efetuada.

## 6.4. Expressões de cálculo

Na determinação pelo Método A, as expressões que permitiram obter as percentagens dos princípios ativos são:

- Determinação de TEC:

$$\% TEC = \frac{A_{TEC(A)} \times M_{TEC(P)} \times Pureza_{TEC}}{A_{TEC(P)} \times M_A \times 20} \times 100 \quad (6.1)$$

Em que:

$A_{TEC(A)}$  – Área do pico de TEC na amostra

$M_{TEC(P)}$  – Massa de TEC na solução padrão (mg)

$A_{TEC(P)}$  – Área do pico de TEC na solução padrão

$M_A$  – Massa da amostra (mg)

20 – Fator de diluição

$Pureza_{TEC}$  – Pureza do TEC utilizado

- Determinação de Sensiva:

$$\% Sensiva = \frac{A_{Sensiva(A)} \times M_{Sensiva(P)} \times Pureza_{Sensiva}}{A_{Sensiva(P)} \times M_A \times 20} \times 100 \quad (6.2)$$

Em que:

$A_{Sensiva(A)}$  – Área do pico de Sensiva na amostra

$M_{Sensiva(P)}$  – Massa de Sensiva na solução padrão (mg)

$A_{Sensiva(P)}$  – Área do pico de Sensiva na solução padrão

$M_A$  – Massa da amostra (mg)

20 – Fator de diluição

$Pureza_{EHG}$  – Pureza da Sensiva utilizada

- Determinação de Farnesol:

$$\% Farnesol = \frac{A_{Farnesol(A)} \times M_{Farnesol(P)} \times Pureza_{Farnesol}}{A_{Farnesol(P)} \times M_A \times 20} \times 100 \quad (6.3)$$

Em que:

$A_{Farnesol(A)}$  – Área do pico de Farnesol na amostra

$P_{Farnesol(P)}$  – Massa de Farnesol na solução padrão (mg)

$A_{Farnesol(P)}$  – Área do pico de Farnesol na solução padrão

$P_A$  – Massa da amostra (mg)

## 20 – Fator de diluição

$Pureza_{Farnesol}$  – Pureza do Farnesol utilizado

Já na determinação pelo Método B, as expressões que permitiram obter as percentagens dos princípios ativos são:

### - Determinação de TEC:

$$\% TEC = \frac{A_{TEC(A)} \times A_{DBP(P)} \times M_{TEC(P)} \times M_{DBP(A)}}{M_A \times M_{DBP(P)} \times A_{TEC(P)} \times A_{DBP(A)}} \times 100 \quad (6.4)$$

Em que:

$A_{TEC(A)}$  – Área do pico de TEC na amostra

$A_{DBP(P)}$  – Área do pico de DBP na solução padrão

$M_{TEC(P)}$  – Massa de TEC na solução padrão (g/100 mL)

$M_{DBP(A)}$  – Massa de DBP na amostra (g/100 mL)

$M_A$  – Massa da amostra (g/100 mL)

$M_{DBP(P)}$  – Massa de DBP na solução padrão (g/100 mL)

$A_{TEC(P)}$  – Área do pico de TEC na solução padrão

$A_{DBP(A)}$  – Área do pico de DBP na amostra

### - Determinação de Sensiva:

$$\% Sensiva = \frac{A_{Sensiva(A)} \times A_{DBP(P)} \times M_{Sensiva(P)} \times M_{DBP(A)}}{M_A \times M_{DBP(P)} \times A_{Sensiva(P)} \times A_{DBP(A)}} \times 100 \quad (6.5)$$

Em que:

$A_{Sensiva(A)}$  – Área do pico de Sensiva na amostra

$A_{DBP(P)}$  – Área do pico de DBP na solução padrão

$M_{Sensiva(P)}$  – Massa de Sensiva na solução padrão (g/100 mL)

$M_{DBP(A)}$  – Massa de DBP na amostra (g/100 mL)

$M_A$  – Massa da amostra (g/100 mL)

$M_{DBP(P)}$  – Massa de DBP na solução padrão (g/100 mL)

$A_{Sensiva(P)}$  – Área do pico de Sensiva na solução padrão

$A_{DBP(A)}$  – Área do pico de DBP na amostra

### - Determinação de Farnesol:

$$\% Farnesol = \frac{A_{Farnesol(A)} \times A_{DBP(P)} \times M_{Farnesol(P)} \times M_{DBP(A)}}{M_A \times M_{DBP(P)} \times A_{Farnesol(P)} \times A_{DBP(A)}} \times 100 \quad (6.6)$$

Em que:

$A_{Farnesol(A)}$  – Área do pico de Farnesol na amostra

$A_{DBP(P)}$  – Área do pico de DBP na solução padrão

$P_{Farnesol(P)}$  – Massa de Farnesol na solução padrão (g/100 mL)

$P_{DBP(A)}$  – Massa de DBP na amostra (g/100 mL)

$P_A$  – Massa da amostra (g/100 mL)

$P_{DBP(P)}$  – Massa de DBP na solução padrão (g/100 mL)

$A_{Farnesol(P)}$  – Área do pico de Farnesol na solução padrão

$A_{DBP(A)}$  – Área do pico de DBP na amostra

## 6.5. Condições Cromatográficas

Nas Tabelas 6.1 e 6.2 estão apresentadas as condições cromatográficas utilizadas no método A e B, respectivamente.

Tabela 6.1. Condições cromatográficas relativas ao método A

| Parâmetro          | Condição                             |
|--------------------|--------------------------------------|
| <b>Injetores</b>   |                                      |
|                    | Modo <i>Split</i>                    |
|                    | Temperatura 250 °C                   |
|                    | Pressão 52,8 kPa                     |
|                    | Caudal de He 10,4 mL/min             |
|                    | <i>Split Ratio</i> 5,0:1             |
|                    | <i>Slit Flow</i> 6,0 mL/min          |
|                    | <i>Gas Saver</i> 20,0 mL/min         |
|                    | 2,00 min                             |
| <b>Forno</b>       |                                      |
|                    | <i>Setpoint</i> 100°C                |
|                    | Rampa 6,00 °C/min a 200 °C           |
|                    | 10,00 °C/min a 300 °C                |
|                    | Tempo de corrida 26,67 min           |
| <b>Detetor FID</b> |                                      |
|                    | Temperatura 275°C                    |
|                    | Caudal de H <sub>2</sub> 40,0 mL/min |
|                    | Caudal de ar 450 mL/min              |
|                    | <i>Makeup Flow</i> 45,0 mL/min       |

Tabela 6.2. Condições cromatográficas relativas ao método B

| <b>Parâmetro</b>         | <b>Condição</b>                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| <b>Injetores</b>         |                                  |
| Modo                     | <i>Split</i>                     |
| Temperatura              | 250 °C                           |
| Pressão                  | 81,1 kPa                         |
| Caudal de He             | 12,9 mL/min                      |
| <i>Split Ratio</i>       | 4,8:1                            |
| <i>Slit Flow</i>         | 8,0 mL/min                       |
| <i>Gas Saver</i>         | 20,0 mL/min                      |
|                          | 2,00 min                         |
| <b>Forno</b>             |                                  |
| <i>Setpoint</i>          | 150 °C                           |
| Rampa                    | 150 °C (6,00 min)                |
|                          | 50,00 °C/min a 200 °C (3,00 min) |
|                          | 280 °C (3,00 min)                |
| Tempo de corrida         | 13,00 min                        |
| <b>Detetor FID</b>       |                                  |
| Temperatura              | 300 °C                           |
| Caudal de H <sub>2</sub> | 40,0 mL/min                      |
| Caudal de ar             | 450 mL/min                       |
| <i>Makeup Flow</i>       | 45,0 mL/min                      |

## 7. Resultados e Discussão

A precisão é um parâmetro expresso, geralmente, como coeficiente de variação ( $CV_r$ ). Para além deste parâmetro, são apresentados a média, desvio-padrão ( $Sr$ ) e limite de repetibilidade ( $r$ ), procurando avaliar a repetibilidade uma vez que se considerou os vários ensaios efetuados pelo mesmo operador. De seguida, avaliou-se a precisão intermédia considerando os dois operadores em causa. Os dois métodos em questão foram comparados através do Teste F com o objetivo avaliar se os mesmos teriam diferenças significativas entre si, em termos de precisão. Por fim, as percentagens obtidas foram comparadas com os valores especificados.

### 7.1. Repetibilidade

#### 7.1.1. Determinação de TEC e Sensiva em DEO's

Tal como foi referido no Capítulo 6 foram realizadas 10 injeções. A Tabela 7.1 apresenta uma síntese dos resultados obtidos na respetiva determinação. Os resultados na íntegra encontram-se no Anexo A.

Tabela 7.1. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's.

|                             | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | Sensiva (%)           |
|-----------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>Método A. Operador 1</b> |                    |                     |                       |                    |                     |                       |
| <b>Média</b>                | $5,35 \times 10^2$ | $1,08 \times 10^2$  | 0,148                 | $6,00 \times 10^2$ | $1,19 \times 10^2$  | 0,103                 |
| <b>Sr</b>                   | 24,7               | 4,01                | $6,00 \times 10^{-3}$ | 21,1               | 5,52                | $4,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 4,61               | 3,68                | 3,88                  | 3,52               | 4,61                | 4,28                  |
| <b>r</b>                    | 69,1               | 11,2                | $1,60 \times 10^{-2}$ | 59,1               | 15,5                | $1,20 \times 10^{-2}$ |
| <b>Método A. Operador 2</b> |                    |                     |                       |                    |                     |                       |
| <b>Média</b>                | $5,19 \times 10^2$ | $1,00 \times 10^2$  | 0,150                 | $5,33 \times 10^2$ | $1,09 \times 10^2$  | 0,105                 |
| <b>Sr</b>                   | 26,9               | 5,80                | $7,00 \times 10^{-3}$ | 44,5               | 6,21                | $6,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 5,18               | 5,80                | 4,91                  | 8,33               | 5,69                | 5,28                  |
| <b>r</b>                    | 75,3               | 16,3                | $2,10 \times 10^{-2}$ | $1,24 \times 10^2$ | 17,4                | $1,50 \times 10^{-2}$ |
| <b>Método B. Operador 1</b> |                    |                     |                       |                    |                     |                       |
| <b>Média</b>                | $2,82 \times 10^3$ | $1,50 \times 10^3$  | 0,152                 | $3,49 \times 10^3$ | $1,66 \times 10^3$  | 0,103                 |
| <b>Sr</b>                   | $2,02 \times 10^2$ | 62,6                | $2,00 \times 10^{-3}$ | $2,75 \times 10^2$ | 72,7                | $3,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 7,18               | 4,19                | 1,33                  | 7,88               | 4,38                | 2,71                  |
| <b>r</b>                    | $5,67 \times 10^2$ | $1,75 \times 10^2$  | $6,00 \times 10^{-3}$ | $7,70 \times 10^3$ | $2,04 \times 10^2$  | $8,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>Método B. Operador 2</b> |                    |                     |                       |                    |                     |                       |
| <b>Média</b>                | $2,89 \times 10^3$ | $1,66 \times 10^3$  | 0,150                 | $3,09 \times 10^3$ | $1,59 \times 10^3$  | 0,102                 |
| <b>Sr</b>                   | $6,10 \times 10^2$ | $6,50 \times 10^2$  | $3,00 \times 10^{-3}$ | $3,64 \times 10^2$ | $3,11 \times 10^2$  | $3,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 21,1               | 39,3                | 1,75                  | 11,8               | 19,6                | 3,25                  |
| <b>r</b>                    | $1,71 \times 10^3$ | $1,82 \times 10^3$  | $7,00 \times 10^{-3}$ | $1,02 \times 10^3$ | $8,73 \times 10^2$  | $9,00 \times 10^{-3}$ |

### ▪ Método A

Neste método, de acordo com o procedimento fornecido, seriam expectáveis os picos de TEC e Sensiva, aproximadamente, aos 12 e 9 minutos, respetivamente, na amostra e no padrão.

As Figuras 7.1 e 7.2 mostram um cromatograma da amostra obtido numa das determinações pelo operador 1 e 2, respetivamente, em que é possível observar que os tempos de retenção se encontram de acordo com o esperado em ambos. O primeiro pico, aos 2 minutos, diz respeito ao pico do solvente.

Obtendo os cromatograma da amostra e do padrão que apresentam os tempos de retenção e as áreas, é possível, pelas equações 6.1 e 6.2 determinar a percentagem de TEC e de Sensiva.

Tal como referido, de acordo com a literatura, a precisão, em termos de  $CV_r$ , deverá ser inferior a 10%. Ambos os operadores apresentam um  $CV_r$  associado inferior a 10% em termos de áreas do padrão e da amostra. No entanto, o  $CV_r$  associado ao operador 1 é inferior ao do operador 2. Sendo assim, o operador 1 apresenta uma melhor repetibilidade que o operador 2.

Já o limite de repetibilidade,  $r$ , diz respeito ao valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em ensaios diferentes, com uma probabilidade de 95%, por normal, ou seja, se a diferença entre análises duplicadas de uma mesma amostra será, ou não, significativa.

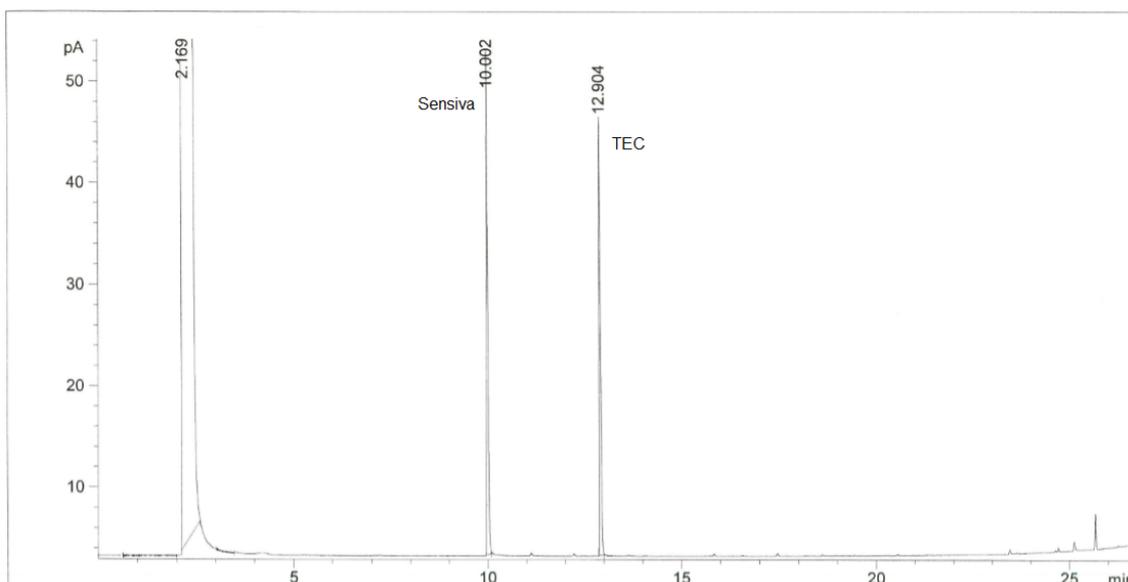


Figura 7.1. Cromatograma relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método A pelo operador 1.

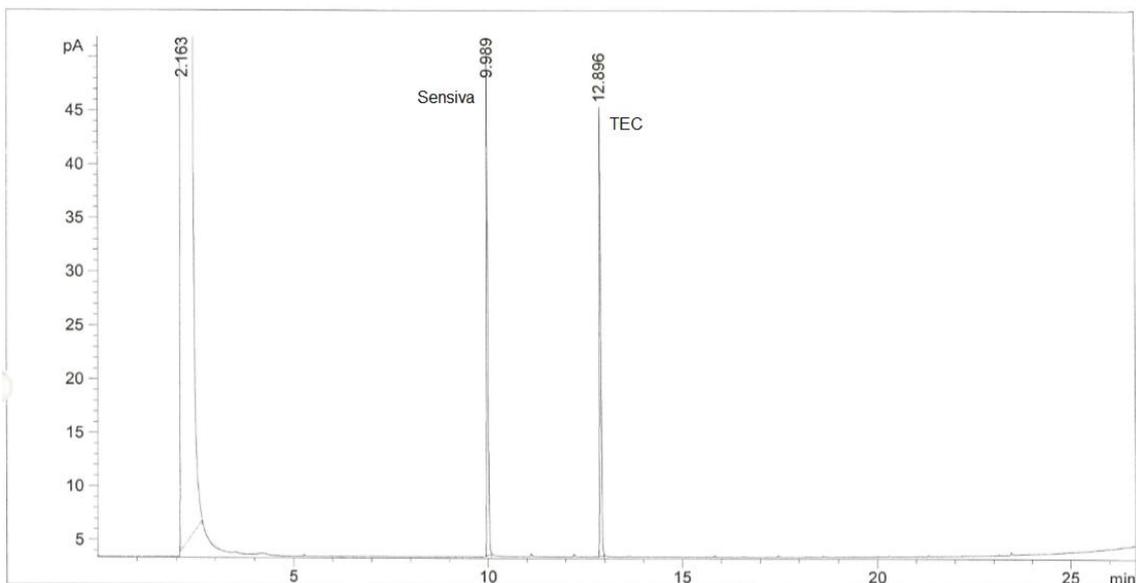


Figura 7.2. Cromatograma relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método A pelo operador 2.

#### ▪ Método B

As Figuras 7.3 e 7.4 apresentam dois cromatogramas da amostra obtidos pelo operador 1 e 2, respetivamente. Conforme o procedimento fornecido, neste método, os picos de retenção são obtidos, aproximadamente, aos 4 minutos para Sensiva, aos 6 minutos para TEC e 8 minutos para o DBP. Observa-se que os tempos de retenção se encontram conforme o esperado. O primeiro pico, aos 1,5 minutos, diz respeito ao pico do solvente.

No entanto, o  $CV_r$  associado ao operador 2 é bastante superior a 10%. Estes valores elevados podem ser devidos a erros aleatórios que ocorreram na preparação das soluções ou na injeção manual da amostra no cromatógrafo.

Ainda, o  $CV_r$  associado ao operador 1 é inferior ao o operador 2 apresentando, desta forma, uma maior repetibilidade.

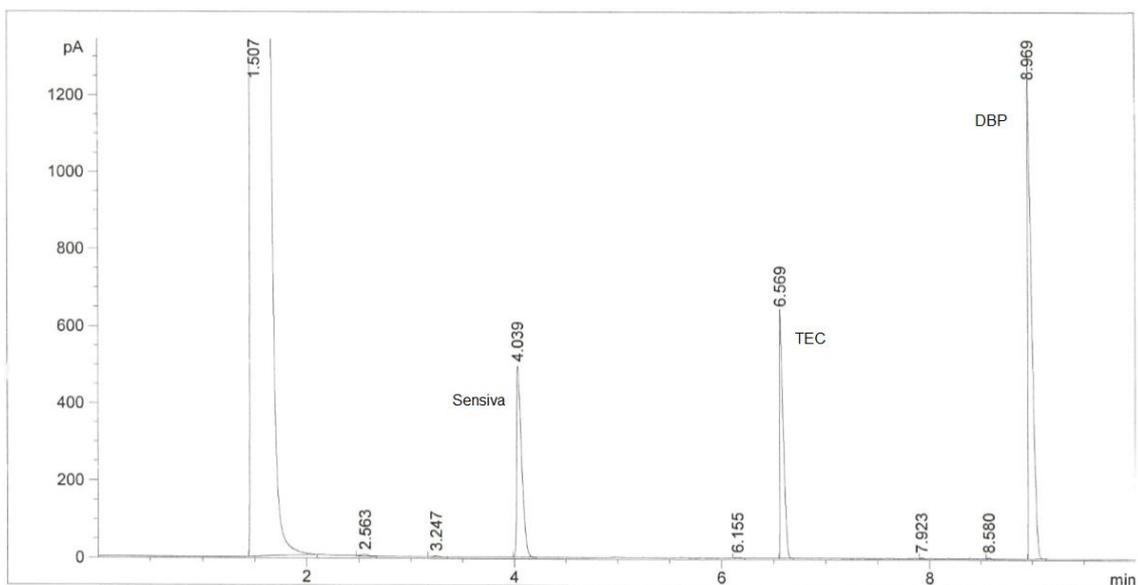


Figura 7.3. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método B pelo operador 1.

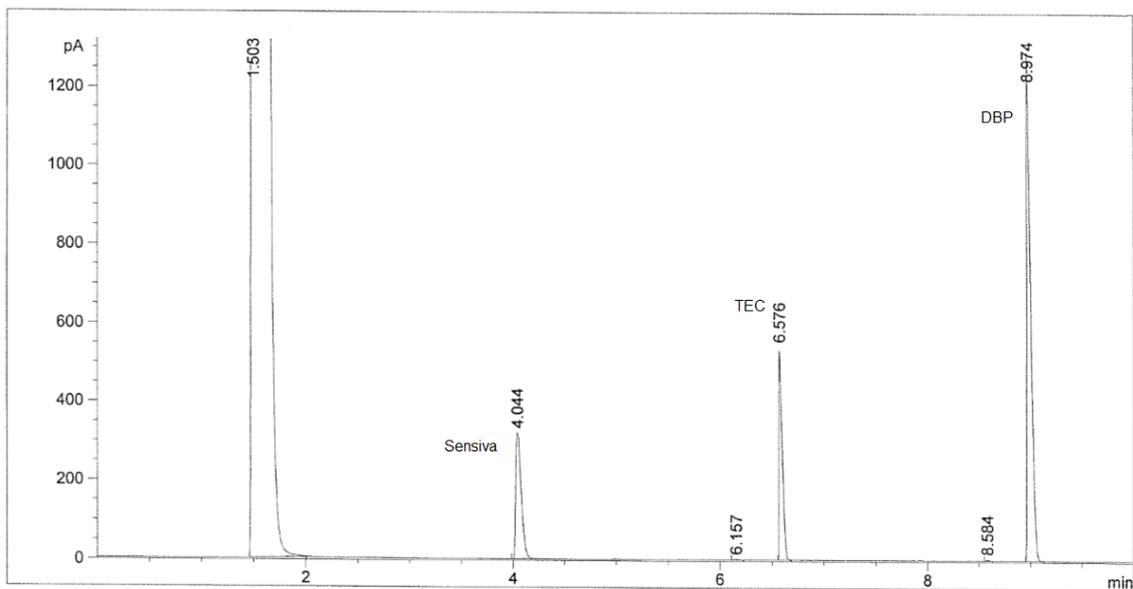


Figura 7.4. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Sensiva pelo Método B pelo operador 2.

### 7.1.2. Determinação de TEC e Sensiva em APD's

A Tabela 7.2 apresenta uma síntese dos resultados obtidos na respectiva determinação. Os resultados na íntegra encontram-se no Anexo B.

No que diz respeito a APD's, apenas foi realizado o Método A uma vez que, neste caso, apenas se considerou o método do cliente.

Tabela 7.2. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva.

|                             | Área<br>Padrão<br>(pA.s) | Área<br>Amostra<br>(pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão<br>(pA.s) | Área Amostra<br>(pA.s) | Sensiva (%)           |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Método A. Operador 1</b> |                          |                           |                       |                       |                        |                       |
| <b>Média</b>                | $5,80 \times 10^2$       | $1,50 \times 10^3$        | 2,00                  | $6,38 \times 10^2$    | $2,03 \times 10^3$     | 1,68                  |
| <b>Sr</b>                   | 31,8                     | 64,7                      | $6,30 \times 10^{-2}$ | 41,1                  | 92,6                   | $4,10 \times 10^{-2}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 5,47                     | 4,30                      | 3,14                  | 6,44                  | 4,55                   | 2,47                  |
| <b>r</b>                    | 89,0                     | $1,81 \times 10^2$        | 0,176                 | $1,15 \times 10^2$    | $2,59 \times 10^2$     | 0,116                 |
| <b>Método A. Operador 2</b> |                          |                           |                       |                       |                        |                       |
| <b>Média</b>                | $6,65 \times 10^2$       | $1,69 \times 10^3$        | 1,95                  | $7,60 \times 10^2$    | $2,30 \times 10^3$     | 1,62                  |
| <b>Sr</b>                   | $2,16 \times 10^2$       | $5,73 \times 10^2$        | $6,80 \times 10^{-2}$ | $2,48 \times 10^2$    | $7,89 \times 10^2$     | $6,30 \times 10^{-2}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 32,6                     | 33,8                      | 3,48                  | 32,7                  | 34,2                   | 3,91                  |
| <b>r</b>                    | $6,07 \times 10^2$       | $1,60 \times 10^3$        | 0,189                 | $6,96 \times 10^2$    | $2,21 \times 10^3$     | 0,178                 |

Foram verificados os mesmos tempos de retenção que em DEO'S sendo que os cromatogramas foram idênticos a estes.

Neste método, e para o operador 2, os  $CV_r$  das áreas da amostra e padrão são muito elevados (32,6 – 34,2) ao contrário do operador 1 que apresenta um valor inferior a 10%, evidenciando, portanto, uma melhor repetibilidade. Estes valores elevados podem dever-se a erros aleatórios ocorridos na preparação das soluções e na injeção manual, como explicado no ponto 7.1.1.

### 7.1.3. Determinação de TEC e Farnesol em DEO's

A síntese dos resultados obtidos na Tabela 7.3. Os resultados na íntegra encontram-se no Anexo C.

Tabela 7.3. Síntese dos resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's

|                             | Área Padrão<br>(pA.s)  | Área Amostra<br>(pA.s) | TEC (%)                 | Área Padrão<br>(pA.s)  | Área<br>Amostra<br>(pA.s) | Farnesol (%)            |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>Método A. Operador 1</b> |                        |                        |                         |                        |                           |                         |
| <b>Média</b>                | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,10 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 8,46 x 10 <sup>2</sup> | 1,73 x 10 <sup>3</sup>    | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                   | 19,2                   | 35,8                   | 5,30 x 10 <sup>-2</sup> | 30,9                   | 57,0                      | 3,50 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 3,68                   | 3,25                   | 3,41                    | 3,66                   | 3,38                      | 3,41                    |
| <b>r</b>                    | 53,9                   | 1,00 x 10 <sup>2</sup> | 0,149                   | 86,6                   | 1,60 x 10 <sup>2</sup>    | 9,90 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>Método A. Operador 2</b> |                        |                        |                         |                        |                           |                         |
| <b>Média</b>                | 4,97 x 10 <sup>2</sup> | 9,89 x 10 <sup>2</sup> | 1,54                    | 7,64 x 10 <sup>2</sup> | 1,52 x 10 <sup>3</sup>    | 1,02                    |
| <b>Sr</b>                   | 29,9                   | 79,5                   | 7,40 x 10 <sup>-2</sup> | 46,0                   | 1,21 x 10 <sup>2</sup>    | 5,00 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 6,01                   | 8,04                   | 4,81                    | 6,02                   | 7,95                      | 4,85                    |
| <b>r</b>                    | 83,7                   | 2,22 x 10 <sup>2</sup> | 0,207                   | 1,28 x 10 <sup>2</sup> | 3,38 x 10 <sup>2</sup>    | 0,139                   |
| <b>Método B. Operador 1</b> |                        |                        |                         |                        |                           |                         |
| <b>Média</b>                | 2,87 x 10 <sup>3</sup> | 1,45 x 10 <sup>3</sup> | 1,57                    | 5,03 x 10 <sup>3</sup> | 2,30 x 10 <sup>3</sup>    | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                   | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 38,9                   | 1,50 x 10 <sup>-2</sup> | 2,12 x 10 <sup>2</sup> | 65,9                      | 1,01 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 3,82                   | 2,69                   | 0,976                   | 4,22                   | 2,86                      | 1,09                    |
| <b>r</b>                    | 3,07 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>3</sup> | 4,30 x 10 <sup>-2</sup> | 5,94 x 10 <sup>2</sup> | 1,8 x 10 <sup>3</sup>     | 3,20 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>Método B. Operador 2</b> |                        |                        |                         |                        |                           |                         |
| <b>Média</b>                | 3,09 x 10 <sup>3</sup> | 1,48 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,14 x 10 <sup>3</sup> | 2,35 x 10 <sup>3</sup>    | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                   | 6,63 x 10 <sup>2</sup> | 55,0                   | 4,50 x 10 <sup>-2</sup> | 2,74 x 10 <sup>2</sup> | 96,0                      | 3,50 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b>   | 21,5                   | 3,72                   | 2,90                    | 5,32                   | 4,09                      | 3,44                    |
| <b>r</b>                    | 1,56 x 10 <sup>3</sup> | 1,54 x 10 <sup>2</sup> | 0,127                   | 7,66 x 10 <sup>2</sup> | 2,69 x 10 <sup>2</sup>    | 9,90 x 10 <sup>-2</sup> |

#### ▪ Método A

Relativamente ao Método A, o Farnesol apresenta dois picos, aproximadamente, aos 13,6 e 13,9 minutos e o TEC apresenta um pico aos 12,8 minutos. As Figuras 7.5 e 7.6 mostram um dos cromatogramas da amostra relativos à determinação pelo operador A e B, respetivamente, podendo-se observar que os picos se obtiveram conforme esperado. Tendo em conta que o Farnesol apresenta dois picos, no cálculo da percentagem de Farnesol através da Equação 6.3, é considerada a soma dos valores das duas áreas dos picos.

O CV<sub>r</sub> associado ao operador 1 é inferior ao do operador 2 e a 10%, pelo que o primeiro apresenta uma melhor repetibilidade que o último.

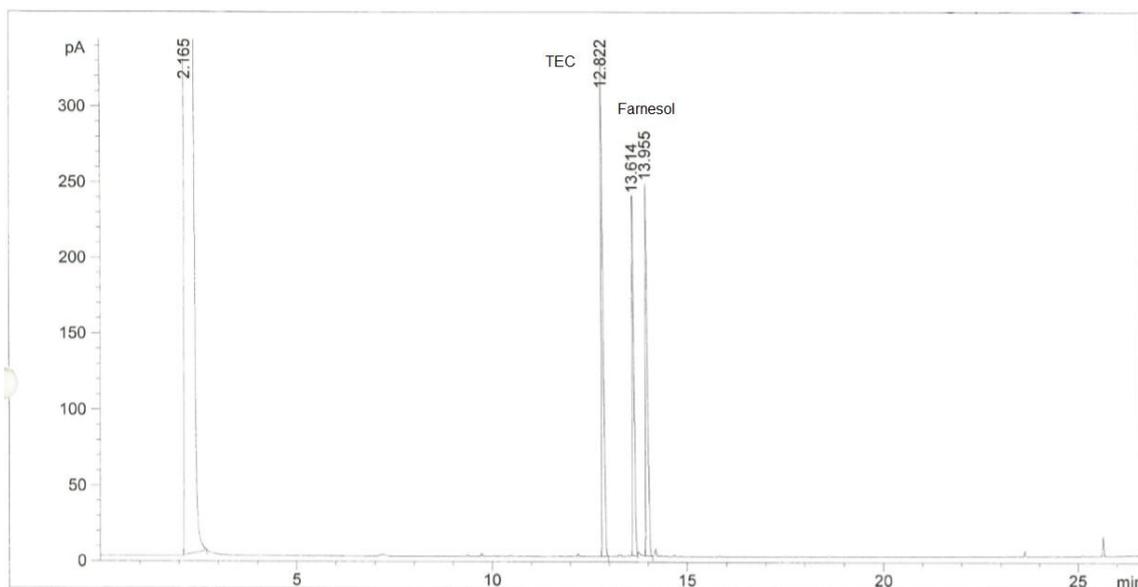


Figura 7.5. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método A pelo operador 1

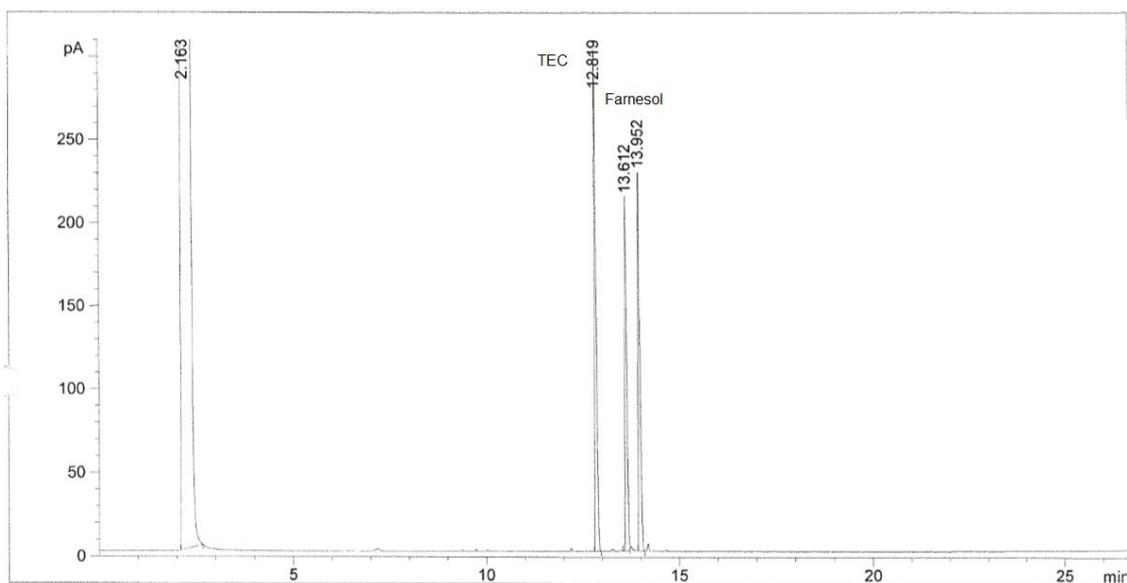


Figura 7.6. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método A pelo operador 2

### ▪ Método B

Neste método, obtiveram-se os picos de Farnesol de acordo com o esperado, aos 6,8 e 6,9 minutos. Já o pico de retenção do TEC apareceu aos 6,5 minutos e o pico de retenção do DBP aos 8,9 minutos, como se pode ver pelas Figuras 7.7 e 7.8. Ainda é visível, aos 1,5 minutos o pico do solvente. De igual forma ao método anterior, o cálculo da percentagem de Farnesol é considerada a soma dos valores das duas áreas dos picos relativos a este princípio ativo.

Mais uma vez, se verificou que o  $CV_r$  associado ao operador 1 é inferior ao do operador 2 e a 10% apresentando uma melhor repetibilidade. O  $CV_r$  associado ao operador 2 é superior a 10% relativamente à área do pico do padrão que podem dever-se a erros ocorridos na preparação das soluções ou na realização da injeção manual, como visto na determinação de TEC e Sensiva.

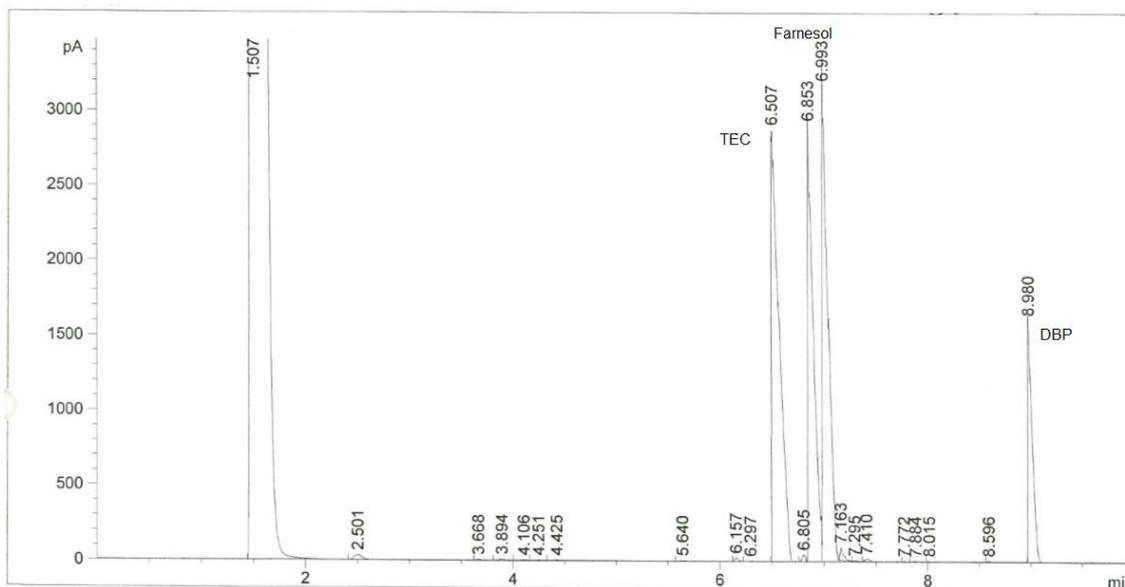


Figura 7.7. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método B pelo operador 1.

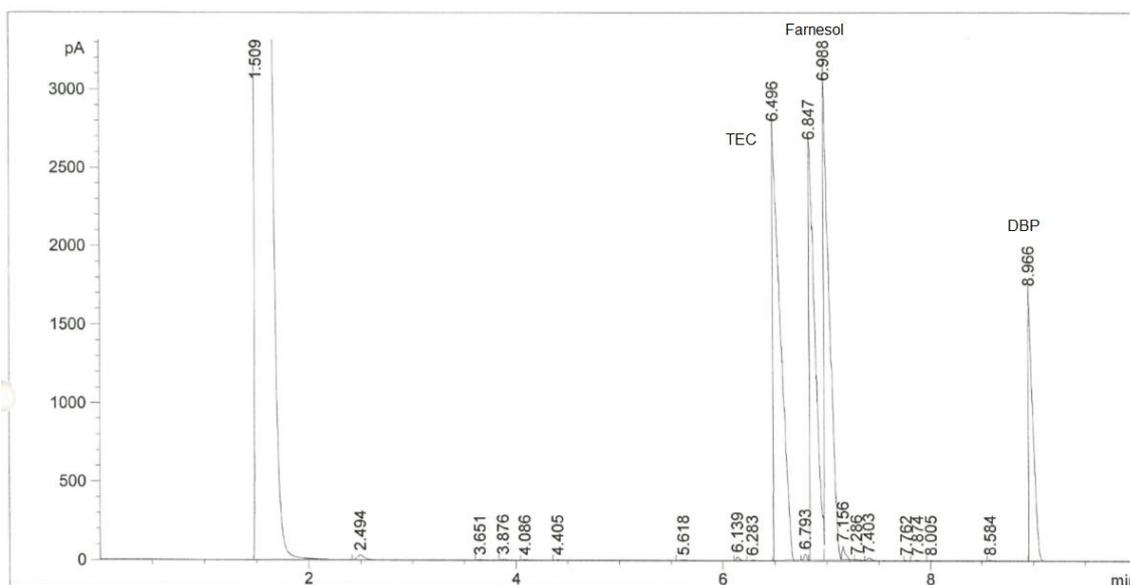


Figura 7.8. Cromatograma da amostra relativo à determinação de TEC e Farnesol pelo Método B pelo operador 2.

Não foi realizada a determinação para APD's uma vez que esta combinação, TEC e Farnesol, apenas é utilizada em DEO's.

## 7.2. Precisão Intermédia

No que diz respeito à precisão intermédia, em cada método, esta foi avaliada por cada princípio ativo com o objetivo de se analisar todas as variações dos operadores.

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, podendo ser avaliada definindo quais as condições a variar. Neste caso, foi considerada a área da amostra e a percentagem de princípio ativo e a variável a considerar foi o operador. Nas Tabelas 7.4 e 7.5 estão patentes os resultados de ambas as determinações no que diz respeito ao cálculo do desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) e o respetivo coeficiente de variação ( $CV_i$ ). Foi utilizada a Equação 5.5 considerando os 2 operadores e as respetivas 10 injeções.

Tabela 7.4. Precisão intermédia obtida na determinação de TEC e Sensiva.

|              | TEC Método A        |                       | Sensiva Método A    |                       | TEC Método B        |                       | Sensiva Método B    |                       |
|--------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
|              | Área Amostra (pA.s) | %                     |
| <b>DEO's</b> |                     |                       |                     |                       |                     |                       |                     |                       |
| $S_i$        | 4,99                | $7,00 \times 10^{-3}$ | 5,88                | $5,00 \times 10^{-3}$ | $4,62 \times 10^2$  | $2,00 \times 10^{-3}$ | $2,26 \times 10^2$  | $3,00 \times 10^{-3}$ |
| $CV_i$ (%)   | 4,78                | 4,43                  | 5,13                | 4,81                  | 29,4                | 1,55                  | 13,9                | 2,99                  |
| <b>APD's</b> |                     |                       |                     |                       |                     |                       |                     |                       |
| $S_i$        | $4,08 \times 10^2$  | $6,50 \times 10^{-2}$ | $5,61 \times 10^2$  | $5,40 \times 10^{-2}$ | -                   | -                     | -                   | -                     |
| $CV_i$ (%)   | 25,5                | 3,31                  | 25,9                | 3,24                  | -                   | -                     | -                   | -                     |

Tabela 7.5. Precisão intermédia obtida na determinação de TEC e Farnesol.

|            | TEC Método A        |                       | Farnesol Método A   |                       | TEC Método B        |                       | Farnesol Método B   |                       |
|------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
|            | Área Amostra (pA.s) | %                     |
| $S_i$      | 61,6                | $6,40 \times 10^{-2}$ | 94,5                | $4,30 \times 10^{-2}$ | 47,6                | $3,40 \times 10^{-2}$ | 82,3                | $2,60 \times 10^{-2}$ |
| $CV_i$ (%) | 5,90                | 4,16                  | 5,89                | 4,19                  | 3,25                | 2,16                  | 3,54                | 2,55                  |

Em ambas as determinações, como se pode verificar, os coeficientes de variação da precisão intermédia apresentaram valores aceitáveis tendo em conta que, segundo a literatura, estes não devem exceder os 10%. Embora, na determinação de TEC e Sensiva, no Método B, existam valores de  $CV_i$  superiores a 10% (29 e 14 pA.s nas áreas da amostra), como as respetivas percentagens apresentam valores inferiores, pode-se considerar os métodos A e B precisos para a precisão intermédia. Estes valores

elevados podem estar relacionados com a influência dos erros aleatórios cometidos pelo operador 2, na preparação das soluções e na injeção manual.

### 7.3. Comparação entre os dois métodos

Por fim, e de forma a ser possível comparar os dois métodos, A e B, foi realizado o Teste Fisher-Snedecor, teste esse que se baseia no cálculo da razão entre as variâncias, ou seja,  $PG = S_A^2/S_B^2$  (as variâncias devem ser colocadas de modo a que a razão seja maior ou igual a um, ou seja, o valor mais alto deve estar no numerador). De seguida, este valor de PG foi comparado com o valor de F (com um grau de significância de 5%), atendendo aos graus de liberdade em questão. Tal permite verificar se os métodos apresentam diferenças significativas entre si, relativamente à precisão. Nesta comparação também se considerou cada princípio ativo, em cada método. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7.6 e 7.7.

O valor de F apresentado considerou que se tratava de 2 operadores que realizaram 10 injeções cada um. Portanto, o grau de liberdade no numerador é 1 (2-1) e no denominador são 19 (20-1) (Ver Anexo D).

Tabela 7.6. Resultados obtidos relativamente ao Teste Fisher-Snedecor na determinação de TEC e Sensiva.

| DEO's               | Método | $S_i$                 | $S_i^2$               | PG                 | F    |
|---------------------|--------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------|
| TEC (%)             | A      | $7,00 \times 10^{-3}$ | $4,90 \times 10^{-5}$ | 12,3               | 4,38 |
|                     | B      | $2,00 \times 10^{-3}$ | $4,00 \times 10^{-6}$ |                    |      |
| Área Amostra (pA.s) | A      | 4,99                  | 24,9                  | $8,55 \times 10^3$ |      |
|                     | B      | $4,62 \times 10^2$    | $2,13 \times 10^5$    |                    |      |
| Sensiva (%)         | A      | $5,00 \times 10^{-3}$ | $2,50 \times 10^{-5}$ | 2,78               |      |
|                     | B      | $3,00 \times 10^{-3}$ | $9,00 \times 10^{-6}$ |                    |      |
| Área Amostra (pA.s) | A      | 5,88                  | 34,6                  | $1,48 \times 10^3$ |      |
|                     | B      | $2,26 \times 10^2$    | $5,11 \times 10^4$    |                    |      |

Tabela 7.7. Resultados obtidos relativamente ao Teste Fisher-Snedecor na determinação de TEC e Farnesol.

| DEO's               | Método | $S_i$                 | $S_i^2$               | PG   | F    |
|---------------------|--------|-----------------------|-----------------------|------|------|
| TEC (%)             | A      | $6,40 \times 10^{-2}$ | $4,10 \times 10^{-3}$ | 3,53 | 4,38 |
|                     | B      | $3,40 \times 10^{-2}$ | $1,16 \times 10^{-3}$ |      |      |
| Área Amostra (pA.s) | A      | 61,6                  | $3,80 \times 10^3$    | 1,67 |      |
|                     | B      | 47,6                  | $2,27 \times 10^3$    |      |      |
| Farnesol (%)        | A      | $4,30 \times 10^{-2}$ | $1,85 \times 10^{-3}$ | 2,74 |      |
|                     | B      | $2,60 \times 10^{-2}$ | $6,76 \times 10^{-4}$ |      |      |
| Área Amostra (pA.s) | A      | 94,5                  | $8,93 \times 10^3$    | 1,34 |      |
|                     | B      | 82,3                  | $6,67 \times 10^3$    |      |      |

De modo a que os dois métodos não apresentem diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões, seria de esperar que  $PG \leq F$ . Isto verifica-se na determinação de TEC e Farnesol em ambos os princípios ativos, tanto nas áreas da amostra como nas percentagens. Contudo, na determinação de TEC e Sensiva, são apresentados valores de PG muito elevados quando comparados com os valores de F, exceto na percentagem de Sensiva. Tal pode ser devido à diferente gama de concentrações existentes (no Método A estão na gama dos 100 pA.s enquanto que no Método B estão na gama dos 1000 pA.s). Isto significa que os dois métodos apresentam diferenças significativas entre si, no que se refere à precisão, devendo-se utilizar o Método B.

Em relação à determinação de TEC e Sensiva em APD's não foi possível realizar o teste F uma vez que não foi realizada esta determinação pelo Método B.

#### 7.4. Especificações

Os valores obtidos de TEC, Sensiva e Farnesol, em ambos os métodos, encontram-se dentro do intervalo de valores especificados tal como se pode verificar pela Tabela 7.8, ou seja, todos os produtos estavam conforme em relação a este parâmetro.

Tabela 7.8. Comparação entre os valores especificados e os valores obtidos.

| Princípios Ativos     | Especificação (%) | Resultados (%) |            |
|-----------------------|-------------------|----------------|------------|
|                       |                   | Operador 1     | Operador 2 |
| <b>Método A DEO's</b> |                   |                |            |
| TEC                   | 0,135 – 0,165     | 0,148          | 0,150      |
| Sensiva               | 0,090 – 0,110     | 0,103          | 0,105      |
| <b>Método B DEO's</b> |                   |                |            |
| TEC                   | 0,135 – 0,165     | 0,152          | 0,150      |
| Sensiva               | 0,090 – 0,110     | 0,103          | 0,102      |
| <b>Método A APD's</b> |                   |                |            |
| TEC                   | 1,770 - 2,150     | 1,998          | 1,945      |
| Sensiva               | 1,470 - 1,790     | 1,681          | 1,619      |
| <b>Método B DEO's</b> |                   |                |            |
| TEC                   | 1,350 – 1,650     | 1,558          | 1,541      |
| Farnesol              | 0,900 – 1,100     | 1,033          | 1,022      |
| <b>Método B DEO's</b> |                   |                |            |
| TEC                   | 1,350 – 1,650     | 1,567          | 1,564      |
| Farnesol              | 0,900 – 1,100     | 1,033          | 1,029      |



## 8. Trabalho complementar desenvolvido na empresa

Para além do tema central da dissertação, foram realizadas outras tarefas ao longo do tempo de estágio que permitiram ter noção de como a empresa funciona ao nível de métodos analíticos, de matérias-primas e produtos, mas também ao nível da produção.

Dado que clientes enviam diversos procedimentos que podem ser empregues na empresa, é necessário efetuar ensaios de modo a verificar se realmente é possível realizá-los com adaptações aos produtos e equipamentos. Ao serem verificados, é necessário efetuar os devidos procedimentos relativos à empresa de forma a poderem ser aprovados e utilizados. O mesmo acontece quando os métodos são otimizados e atualizados. Alguns desses ensaios foram relativos à formação de gel, índice de acidez, análise de perfume utilizando cromatografia gasosa, entre outros.

Relativamente a equipamentos, foram realizados, de igual forma, procedimentos de como utilizar os mesmos, cuidados a ter no seu manuseamento e a respetiva qualificação.

Algo extremamente importante são as fichas técnicas utilizadas no controlo de qualidade que detalham cada parâmetro a ser controlado assim como as respetivas especificações. Deste modo, foi necessário avaliar se as fichas técnicas em questão apresentavam toda a informação devidamente detalhada e atualizada, como as unidades de medida corretas, o código do procedimento e as especificações atualizadas e, adaptar toda a informação de acordo com o cliente e os fornecedores. Isto relativamente às fichas técnicas de *bulks* e às matérias-primas.

O DT é ainda responsável por efetuar, em conjunto com o Departamento de Qualidade, os *qualifyings*. No fundo, este procedimento passa por qualificar uma linha de produção, isto é, quando algo é alterado numa dada linha de produção pela primeira vez, como por exemplo, o tipo de produto a encher, são escolhidas um número específico de latas, válvulas e atuadores, identificados e colocados na linha de produção, como se de uma produção normal se tratasse. No fim, retiram-se essas latas da linha no momento específico conforme aquilo que se queira testar, ou seja, as medidas de cravação, a quantidade de produto, entre outros. O objetivo é verificar, de facto, que a linha está qualificada para encher o dado produto com as alterações existentes.

Por último, e algo relacionado com o tema do trabalho, foi realizada a manutenção do equipamento de GC utilizado na empresa permitindo aprender, na prática, as melhores formas de substituir cada componente.



## 9. Conclusões e considerações finais

Na área da cosmética é imprescindível que os ingredientes utilizados na formulação dos produtos estejam em quantidades controladas e dentro de valores especificados. Deste modo, é necessário proceder à sua análise através de métodos que se encontrem validados e verificados de forma a obter resultados fidedignos.

A presente dissertação teve com objetivo principal a avaliação da precisão através da repetibilidade e precisão intermédia na determinação de TEC, Sensiva e Farnesol em DEO's e APD's e comparação dos métodos, na unidade de enchimento da Colep utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa com FID. Foram avaliados dois métodos, A, fornecido por um cliente, e B, desenvolvido pela empresa, que foram analisados por dois operadores, 1 e 2.

O coeficiente de variação associado ao operador 1 apresentou-se inferior ao do operador 2 em todos os métodos, revelando uma melhor repetibilidade por parte do operador 1. O operador 2 apresentou um coeficiente de variação superior a 10% em algumas determinações, possivelmente devido a erros aleatórios que aconteceram na preparação das soluções ou na própria injeção manual no cromatógrafo.

Em relação à precisão intermédia, a variação existente foi no operador pelo que se avaliou o coeficiente de variação de cada princípio ativo e para cada método. Todos os resultados de  $CV_r$  foram inferiores a 10 %, exceto para as áreas da amostra relativamente ao TEC e Sensiva no Método B. Isto pode estar relacionado com o facto do operador 2 esta mais sujeito a erros aleatórios.

Verificou-se se existiam diferenças significativas entre os métodos A e B, relativamente às suas precisões, efetuando-se o teste Fisher-Snedecor. Aferiu-se que na determinação de TEC e Farnesol não se observaram diferenças significativas. Contudo, na determinação de TEC e Sensiva, existiram diferenças entre os métodos uma vez que, relativamente às áreas da amostra, o Método A e B apresentaram diferenças significativas na gama de concentrações. Assim, deve ser utilizado o Método B.

Por fim, foi possível concluir que o produto estava conforme dado que as percentagens de TEC, Sensiva e Farnesol obtidas apresentaram-se dentro do intervalo de valores especificados.

Embora o método do cliente prevaleça sobre qualquer método, é relevante notar que o Método B apresenta um tempo de corrida substancialmente inferior ao Método A pelo que poderá ser a primeira escolha aquando em análises que necessitem de alguma rapidez na obtenção de resultados. Sendo assim, e embora o Método B apenas deva

ser utilizado em situações de dúvida, seria adequado, no futuro, proceder à sua validação de modo a garantir a confiança dos resultados.

## Referências

- [1] “Colep, a RAR Group company | Colep.” Disponível: <http://www.colep.com/>. [Acedido: 11-Mar-2018].
- [2] R. C. P. Alves, “Análise e propostas de melhorias de processos no Departamento de Engenharia da COLEP,” Tese de Mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade de Coimbra, 2012.
- [3] “Grupo RAR.” Disponível: [http://www.rar.com/pt/grupo\\_rar\\_fecha\\_2016\\_com\\_lucros\\_de\\_74\\_milhoes\\_de\\_euros/](http://www.rar.com/pt/grupo_rar_fecha_2016_com_lucros_de_74_milhoes_de_euros/). [Acedido: 17-Mar-2018].
- [4] “Colep Values | Colep.” Disponível: <http://www.colep.com/about-us/values>. [Acedido: 04-Mar-2018].
- [5] J. dos S. Barbosa, “Detecção e eliminação das perdas de eficiência numa linha de produção de enchimento de aerossóis,” Tese de Mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade do Porto, 2016.
- [6] Colep, “Documento Interno - Manual de Ambiente.” pp. 1–23, 2018.
- [7] Colep, “Documento Interno - Organizational Chart.” 2018.
- [8] D. do A. S. Lopo, “Integração da Gestão da Procura no Processo de Planeamento da Produção e Gestão de Compras : Indústria de Embalagens Metálicas – O caso da COLEP,” Tese de Mestrado em Engenharia e Gestão Industrial. Instituto Superior Técnico, 2014.
- [9] “Cosmetics and Skin: Aerosol Cosmetics,” 2018. Disponível: <http://cosmeticsandskin.com/efe/aerosols.php>. [Acedido: 07-Abr-2018].
- [10] Jornal Oficial Da União Europeia, “Diretiva nº 75/324/CEE do Conselho, de 20 de Maio de 1975 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes às embalagens aerossóis.” 2013.
- [11] L. Tavares, ““Fazer da Química uma Bela Arte - Perspetivas de uma Carreira Profissional.”” pp. 1–48, 2017 (Versão PDF descarregada em 11-Mar-2018).
- [12] C. Ribeiro, “Desenvolvimento de Métodos para a Determinação de Princípios Ativos em Inseticidas, Usando Cromatografia Gasosa,” Relatório de Estágio. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2013.
- [13] G. Borini, “Aerossóis: Sistemas Pressurizados.” 2011 (Versão PDF descarregada

em 07-Abr-2018).

- [14] B. Daria, "Aerosol Valves and Actuators." LINDAL North America, 2010.
- [15] ChemService, "Which chemicals make deodorants and antiperspirants work?" Disponível: <https://www.chemservice.com/news/2014/08/which-chemicals-make-deodorants-and-antiperspirants-work/>. [Acedido: 22-Maio-2018].
- [16] "Triethyl citrate | C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> - PubChem." Disponível: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triethyl\\_citrate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triethyl_citrate#section=Top). [Acedido: 24-Mar-2018].
- [17] H. Niendorf, "Natural deodorising active for modern formulations," pp. 39–42, 2012.
- [18] "Hydagen CAT msds| properties| cas no| molecular formula | WorldOfChemicals." Disponível: <https://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/hydagen-cat.html>. [Acedido: 02-Jun-2018].
- [19] K. Laden, *Antiperspirants and Deodorants*. Marcel Dekker, Inc., 1999.
- [20] E. thermale Avène, "10 Perguntas sobre cosmética estéril." Disponível: <https://www.eau-thermale-avene.pt/actualidades/201310231424/10-perguntas-sobre-cosmetica-esteril>. [Acedido: 29-Set-2018].
- [21] O. Aerts, L. Verhulst, and A. Goossens, "Ethylhexylglycerin: A low-risk, but highly relevant, sensitizer in 'hypo-allergenic' cosmetics," *Contact Dermatitis*, vol. 74, no. 5, pp. 281–288, 2016.
- [22] M. Leschke, "Ethylhexylglycerin for a Improved Skin Feel," *Int. J. Appl. Sci.*, vol. 138, no. 8, pp. 10–23, 2010.
- [23] S. & M. GmbH, "sensiva® SC 50 Multifunctional cosmetic ingredient." Germany.
- [24] M. Leschke and M. GmbH, "A Multifunctional Ingredient for Leave on Cosmetics," *Cosmet. Sci. Technol.*, 2006.
- [25] "Farnesol | C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O - PubChem." Disponível: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/farnesol#section=Top>. [Acedido: 25-Mar-2018].
- [26] "Farnesol | Cosmetics Info." Disponível: <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/farnesol-0>. [Acedido: 25-Mar-2018].
- [27] Jornal Oficial Da União Europeia, "Regulamento nº1221/2009 de 25 de Novembro

- do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos.” pp. 1–45, 2009.
- [28] D. Skoog, D. West, J. Holler, and S. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed. 2013.
- [29] S. K. Bhardwaj, K. Dwivedi, and D. D. Agarwal, “A Review: GC Method Development and validation,” *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [30] J. Trigo, “Implementação de métodos para análise de matrizes alimentares por GC-FID,” Tese de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2016.
- [31] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed. 2010.
- [32] A. Martins, “Implementação e Validação de Métodos Analíticos,” Tese de Mestrado em Química. Universidade de Coimbra, 2016.
- [33] C. Beach, P. Dauenhauer, and W. A. Se, “Quantification of Compounds with Low or Negligible Response in Traditional FID using the Polyarc® Reactor Application Note Low Sensitivity Compounds,” *Act. Res. Company, LLC*, pp. 1–7, 2017.
- [34] MindTouch, “Gas Chromatography.” Disponível: [https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography). [Acedido: 31-Mar-2018].
- [35] CHROMacademy, “Theory and Instrumentation of GC Sample Introduction,” *Crawford Scientific*. pp. 1–39, 2012.
- [36] K. Weber and K. Stoffels, “Ethylhexylglycerin – Highly Pure Quality by Patented Stabilisation,” *Int. J. Appl. Sci.*, vol. 141, no. 4, pp. 48–51, 2015.
- [37] A. Chisvert, M. López-Nogueroles, P. Miralles, and A. Salvador, “Perfumes in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods,” in *Analysis of Cosmetic Products*, Second Edi., Elsevier B.V., 2018, pp. 225–248.
- [38] M. I. López, M. P. Callao, and I. Ruisánchez, “A tutorial on the validation of qualitative methods: from the univariate to the multivariate approach,” *Anal. Chim. Acta*, 2015.
- [39] J. Peris-Vicente, J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, “Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview,” *Anal. Sep. Sci.*, vol. 5, pp. 1757–1808, 2015.

- [40] A. de L. A. Portugal, *Guia Relacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Relacre. 2000.
- [41] Colep, “Documento Interno - Validation of an Analytical Test Method.”
- [42] L. Huber, “Validation of Analytical Methods.” Agilent Technology, 2010.
- [43] L. and S. Section, *Guidance for Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. New York: United Nations Publications, 2009.
- [44] J. C. D. Costa, “Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios,” Tese de Mestrado em Engenharia Biológica. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2015.
- [45] A. J. P. Carvalho, “Implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de Vitamina E por HPLC,” Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [46] I. E. W. Group, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 2005.
- [47] B. Magnusson and U. Ornemark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed. 2014.
- [48] S. Ross, *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*, 4th ed. Berkeley: Academic Press, 2009.

## Anexos

### Anexo A. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's

Tabela A. 1. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's pelo Método A pelo operador 1.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Sensiva (%)             |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 5,50 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 0,139                   | 6,30 x 10 <sup>2</sup> | 1,22 x 10 <sup>2</sup> | 9,70 x 10 <sup>-2</sup> |
| 2                         | 5,14 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 0,149                   | 5,77 x 10 <sup>2</sup> | 1,22 x 10 <sup>2</sup> | 0,106                   |
| 3                         | 5,06 x 10 <sup>2</sup> | 1,12 x 10 <sup>2</sup> | 0,156                   | 5,72 x 10 <sup>2</sup> | 1,24 x 10 <sup>2</sup> | 0,109                   |
| 4                         | 5,35 x 10 <sup>2</sup> | 1,12 x 10 <sup>2</sup> | 0,147                   | 6,10 x 10 <sup>2</sup> | 1,25 x 10 <sup>2</sup> | 0,103                   |
| 5                         | 5,49 x 10 <sup>2</sup> | 1,15 x 10 <sup>2</sup> | 0,147                   | 6,27 x 10 <sup>2</sup> | 1,27 x 10 <sup>2</sup> | 0,101                   |
| 6                         | 5,34 x 10 <sup>2</sup> | 1,10 x 10 <sup>2</sup> | 0,144                   | 6,09 x 10 <sup>2</sup> | 1,21 x 10 <sup>2</sup> | 0,100                   |
| 7                         | 5,15 x 10 <sup>2</sup> | 1,02 x 10 <sup>2</sup> | 0,148                   | 5,79 x 10 <sup>2</sup> | 1,10 x 10 <sup>2</sup> | 0,103                   |
| 8                         | 5,18 x 10 <sup>2</sup> | 1,19 x 10 <sup>2</sup> | 0,157                   | 5,91 x 10 <sup>2</sup> | 1,20 x 10 <sup>2</sup> | 0,109                   |
| 9                         | 5,90 x 10 <sup>2</sup> | 1,06 x 10 <sup>2</sup> | 0,152                   | 5,91 x 10 <sup>2</sup> | 1,16 x 10 <sup>2</sup> | 0,106                   |
| 10                        | 5,41 x 10 <sup>2</sup> | 1,03 x 10 <sup>2</sup> | 0,142                   | 6,17 x 10 <sup>2</sup> | 1,12 x 10 <sup>2</sup> | 9,70 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>Média</b>              | 5,35 x 10 <sup>2</sup> | 1,08 x 10 <sup>2</sup> | 0,148                   | 6,00 x 10 <sup>2</sup> | 1,19 x 10 <sup>2</sup> | 0,103                   |
| <b>Sr</b>                 | 24,7                   | 4,01                   | 6,00 x 10 <sup>-3</sup> | 21,1                   | 5,52                   | 4,00 x 10 <sup>-3</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 4,61                   | 3,68                   | 3,88                    | 3,52                   | 4,61                   | 4,28                    |
| <b>r</b>                  | 69,1                   | 11,2                   | 1,60 x 10 <sup>-2</sup> | 59,1                   | 15,5                   | 1,20 x 10 <sup>-2</sup> |

Tabela A. 2. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's pelo Método A pelo operador 2.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Sensiva (%)             |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 4,63 x 10 <sup>2</sup> | 92,0                   | 0,156                   | 4,45 x 10 <sup>2</sup> | 99,9                   | 0,109                   |
| 2                         | 5,35 x 10 <sup>2</sup> | 1,06 x 10 <sup>2</sup> | 0,155                   | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,16 x 10 <sup>2</sup> | 0,109                   |
| 3                         | 4,91 x 10 <sup>2</sup> | 91,1                   | 0,145                   | 4,93 x 10 <sup>2</sup> | 1,01 x 10 <sup>2</sup> | 0,101                   |
| 4                         | 5,05 x 10 <sup>2</sup> | 1,00 x 10 <sup>2</sup> | 0,155                   | 5,00 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 0,108                   |
| 5                         | 5,19 x 10 <sup>2</sup> | 1,02 x 10 <sup>2</sup> | 0,153                   | 5,13 x 10 <sup>2</sup> | 1,11 x 10 <sup>2</sup> | 0,107                   |
| 6                         | 5,39 x 10 <sup>2</sup> | 1,04 x 10 <sup>2</sup> | 0,151                   | 5,45 x 10 <sup>2</sup> | 1,11 x 10 <sup>2</sup> | 0,101                   |
| 7                         | 5,29 x 10 <sup>2</sup> | 1,15 x 10 <sup>2</sup> | 0,154                   | 5,69 x 10 <sup>2</sup> | 1,17 x 10 <sup>2</sup> | 0,110                   |
| 8                         | 5,57 x 10 <sup>2</sup> | 99,6                   | 0,139                   | 5,99 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 0,098                   |
| 9                         | 5,21 x 10 <sup>2</sup> | 1,07 x 10 <sup>2</sup> | 0,158                   | 5,64 x 10 <sup>2</sup> | 1,15 x 10 <sup>2</sup> | 0,110                   |
| 10                        | 5,32 x 10 <sup>2</sup> | 94,2                   | 0,137                   | 5,75 x 10 <sup>2</sup> | 1,03 x 10 <sup>2</sup> | 0,095                   |
| <b>Média</b>              | 5,19 x 10 <sup>2</sup> | 1,00 x 10 <sup>2</sup> | 0,150                   | 5,33 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 0,105                   |
| <b>Sr</b>                 | 26,9                   | 5,80                   | 7,00 x 10 <sup>-3</sup> | 44,5                   | 6,21                   | 6,00 x 10 <sup>-3</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 5,18                   | 5,80                   | 4,91                    | 8,33                   | 5,69                   | 5,28                    |
| <b>r</b>                  | 75,3                   | 16,3                   | 2,10 x 10 <sup>-2</sup> | 1,24 x 10 <sup>2</sup> | 17,4                   | 1,50 x 10 <sup>-2</sup> |

Tabela A. 3. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's pelo Método B pelo operador 1.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | Sensiva (%)           |
|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1                         | $2,59 \times 10^3$ | $1,46 \times 10^3$  | 0,156                 | $3,10 \times 10^3$ | $1,62 \times 10^3$  | 0,109                 |
| 2                         | $2,57 \times 10^3$ | $1,47 \times 10^3$  | 0,153                 | $3,14 \times 10^3$ | $1,63 \times 10^3$  | 0,105                 |
| 3                         | $2,92 \times 10^3$ | $1,40 \times 10^3$  | 0,149                 | $3,64 \times 10^3$ | $1,55 \times 10^3$  | 0,099                 |
| 4                         | $2,68 \times 10^3$ | $1,61 \times 10^3$  | 0,150                 | $3,35 \times 10^3$ | $1,78 \times 10^3$  | 0,101                 |
| 5                         | $2,63 \times 10^3$ | $1,41 \times 10^3$  | 0,150                 | $3,27 \times 10^3$ | $1,57 \times 10^3$  | 0,101                 |
| 6                         | $3,20 \times 10^3$ | $1,56 \times 10^3$  | 0,151                 | $3,97 \times 10^3$ | $1,73 \times 10^3$  | 0,102                 |
| 7                         | $2,94 \times 10^3$ | $1,51 \times 10^3$  | 0,153                 | $3,66 \times 10^3$ | $1,68 \times 10^3$  | 0,103                 |
| 8                         | $2,77 \times 10^3$ | $1,48 \times 10^3$  | 0,151                 | $3,46 \times 10^3$ | $1,66 \times 10^3$  | 0,103                 |
| 9                         | $2,92 \times 10^3$ | $1,53 \times 10^3$  | 0,152                 | $3,63 \times 10^3$ | $1,72 \times 10^3$  | 0,104                 |
| 10                        | $2,95 \times 10^3$ | $1,50 \times 10^3$  | 0,151                 | $3,69 \times 10^3$ | $1,63 \times 10^3$  | 0,101                 |
| <b>Média</b>              | $2,82 \times 10^3$ | $1,50 \times 10^3$  | 0,152                 | $3,49 \times 10^3$ | $1,66 \times 10^3$  | 0,103                 |
| <b>Sr</b>                 | $2,02 \times 10^2$ | 62,6                | $2,00 \times 10^{-3}$ | $2,75 \times 10^2$ | 72,7                | $3,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 7,18               | 4,19                | 1,33                  | 7,88               | 4,38                | 2,71                  |
| <b>r</b>                  | $5,67 \times 10^2$ | $1,75 \times 10^2$  | $6,00 \times 10^{-3}$ | $7,70 \times 10^3$ | $2,04 \times 10^2$  | $8,00 \times 10^{-3}$ |

Tabela A. 4. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em DEO's pelo Método B pelo operador 2.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | Sensiva (%)           |
|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1                         | $3,04 \times 10^3$ | $1,12 \times 10^3$  | 0,146                 | $3,04 \times 10^3$ | $1,20 \times 10^3$  | $9,70 \times 10^{-2}$ |
| 2                         | $2,30 \times 10^3$ | $9,15 \times 10^2$  | 0,152                 | $2,35 \times 10^3$ | $9,76 \times 10^2$  | 0,103                 |
| 3                         | $1,42 \times 10^3$ | $3,33 \times 10^3$  | 0,154                 | $3,31 \times 10^3$ | $1,58 \times 10^3$  | 0,107                 |
| 4                         | $2,89 \times 10^3$ | $1,54 \times 10^3$  | 0,150                 | $2,91 \times 10^3$ | $1,70 \times 10^3$  | 0,102                 |
| 5                         | $3,06 \times 10^3$ | $1,54 \times 10^3$  | 0,154                 | $3,02 \times 10^3$ | $1,70 \times 10^3$  | 0,107                 |
| 6                         | $3,24 \times 10^3$ | $1,48 \times 10^3$  | 0,149                 | $3,32 \times 10^3$ | $1,64 \times 10^3$  | 0,101                 |
| 7                         | $3,06 \times 10^3$ | $1,55 \times 10^3$  | 0,150                 | $3,06 \times 10^3$ | $1,55 \times 10^3$  | 0,100                 |
| 8                         | $2,95 \times 10^3$ | $1,92 \times 10^3$  | 0,148                 | $3,01 \times 10^3$ | $2,09 \times 10^3$  | $9,90 \times 10^{-2}$ |
| 9                         | $3,42 \times 10^3$ | $1,70 \times 10^3$  | 0,149                 | $3,44 \times 10^3$ | $1,85 \times 10^3$  | 0,101                 |
| 10                        | $3,50 \times 10^3$ | $1,47 \times 10^3$  | 0,148                 | $3,57 \times 10^3$ | $1,61 \times 10^3$  | $9,90 \times 10^{-2}$ |
| <b>Média</b>              | $2,89 \times 10^3$ | $1,66 \times 10^3$  | 0,150                 | $3,09 \times 10^3$ | $1,59 \times 10^3$  | 0,102                 |
| <b>Sr</b>                 | $6,10 \times 10^2$ | $6,50 \times 10^2$  | $3,00 \times 10^{-3}$ | $3,64 \times 10^2$ | $3,11 \times 10^2$  | $3,00 \times 10^{-3}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 21,1               | 39,3                | 1,75                  | 11,8               | 19,6                | 3,25                  |
| <b>r</b>                  | $1,71 \times 10^3$ | $1,82 \times 10^3$  | $7,00 \times 10^{-3}$ | $1,02 \times 10^3$ | $8,73 \times 10^2$  | $9,00 \times 10^{-3}$ |

## Anexo B. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em APD's.

Tabela B. 5. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em APD's pelo Método A pelo operador 1.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | Sensiva (%)           |
|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1                         | $5,62 \times 10^2$ | $1,56 \times 10^3$  | 2,12                  | $6,07 \times 10^2$ | $2,11 \times 10^3$  | 1,73                  |
| 2                         | $5,77 \times 10^2$ | $1,48 \times 10^3$  | 1,95                  | $6,32 \times 10^2$ | $2,00 \times 10^3$  | 1,64                  |
| 3                         | $5,46 \times 10^2$ | $1,43 \times 10^3$  | 2,00                  | $5,96 \times 10^2$ | $1,94 \times 10^3$  | 1,69                  |
| 4                         | $5,91 \times 10^2$ | $1,54 \times 10^3$  | 2,00                  | $6,51 \times 10^2$ | $2,09 \times 10^3$  | 1,67                  |
| 5                         | $5,50 \times 10^2$ | $1,49 \times 10^3$  | 2,07                  | $6,03 \times 10^2$ | $2,01 \times 10^3$  | 1,73                  |
| 6                         | $5,88 \times 10^2$ | $1,50 \times 10^3$  | 1,95                  | $6,49 \times 10^2$ | $2,05 \times 10^3$  | 1,64                  |
| 7                         | $5,51 \times 10^2$ | $1,38 \times 10^3$  | 2,00                  | $5,89 \times 10^2$ | $1,83 \times 10^3$  | 1,70                  |
| 8                         | $5,91 \times 10^2$ | $1,51 \times 10^3$  | 2,00                  | $6,70 \times 10^2$ | $2,04 \times 10^3$  | 1,66                  |
| 9                         | $6,51 \times 10^2$ | $1,69 \times 10^3$  | 1,91                  | $7,18 \times 10^2$ | $2,13 \times 10^3$  | 1,62                  |
| 10                        | $6,03 \times 10^2$ | $1,56 \times 10^3$  | 2,03                  | $6,72 \times 10^2$ | $2,13 \times 10^3$  | 1,73                  |
| <b>Média</b>              | $5,80 \times 10^2$ | $1,50 \times 10^3$  | 2,00                  | $6,38 \times 10^2$ | $2,03 \times 10^3$  | 1,68                  |
| <b>Sr</b>                 | 31,8               | 64,7                | $6,30 \times 10^{-2}$ | 41,1               | 92,6                | $4,10 \times 10^{-2}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 5,47               | 4,30                | 3,14                  | 6,44               | 4,55                | 2,47                  |
| <b>r</b>                  | 89,0               | $1,81 \times 10^2$  | 0,176                 | $1,15 \times 10^2$ | $2,59 \times 10^2$  | 0,116                 |

Tabela B. 6. Resultados obtidos na determinação de TEC e Sensiva em APD's pelo Método A pelo operador 2.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | TEC (%)               | Área Padrão (pA.s) | Área Amostra (pA.s) | Sensiva (%)           |
|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1                         | $5,08 \times 10^2$ | $1,31 \times 10^3$  | 1,97                  | $5,71 \times 10^2$ | $1,75 \times 10^3$  | 1,64                  |
| 2                         | $8,76 \times 10^2$ | $2,33 \times 10^3$  | 2,03                  | $9,90 \times 10^2$ | $3,18 \times 10^3$  | 1,71                  |
| 3                         | $9,11 \times 10^2$ | $2,17 \times 10^3$  | 1,81                  | $1,04 \times 10^3$ | $2,93 \times 10^3$  | 1,50                  |
| 4                         | $9,29 \times 10^2$ | $2,38 \times 10^3$  | 1,95                  | $1,17 \times 10^3$ | $3,25 \times 10^3$  | 1,63                  |
| 5                         | $9,29 \times 10^2$ | $2,48 \times 10^3$  | 2,04                  | $1,16 \times 10^3$ | $3,40 \times 10^3$  | 1,70                  |
| 6                         | $5,40 \times 10^2$ | $1,32 \times 10^3$  | 1,86                  | $6,06 \times 10^2$ | $1,77 \times 10^3$  | 1,56                  |
| 7                         | $5,68 \times 10^2$ | $1,46 \times 10^3$  | 1,96                  | $6,60 \times 10^2$ | $1,99 \times 10^3$  | 1,61                  |
| 8                         | $5,40 \times 10^2$ | $1,39 \times 10^3$  | 1,95                  | $6,25 \times 10^2$ | $1,87 \times 10^3$  | 1,60                  |
| 9                         | $4,02 \times 10^2$ | $1,00 \times 10^3$  | 1,95                  | $4,64 \times 10^2$ | $1,40 \times 10^3$  | 1,65                  |
| 10                        | $4,54 \times 10^2$ | $1,12 \times 10^3$  | 1,93                  | $5,13 \times 10^2$ | $1,50 \times 10^3$  | 1,60                  |
| <b>Média</b>              | $6,65 \times 10^2$ | $1,69 \times 10^3$  | 1,95                  | $7,60 \times 10^2$ | $2,30 \times 10^3$  | 1,62                  |
| <b>Sr</b>                 | $2,16 \times 10^2$ | $5,73 \times 10^2$  | $6,80 \times 10^{-2}$ | $2,48 \times 10^2$ | $7,89 \times 10^2$  | $6,30 \times 10^{-2}$ |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 32,6               | 33,8                | 3,48                  | 32,7               | 34,2                | 3,91                  |
| <b>r</b>                  | $6,07 \times 10^2$ | $1,60 \times 10^3$  | 0,189                 | $6,96 \times 10^2$ | $2,21 \times 10^3$  | 0,178                 |

### Anexo C. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's.

Tabela C. 1. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's pelo Método A pelo operador 1.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Farnesol (%)            |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 5,53 x 10 <sup>2</sup> | 1,15 x 10 <sup>3</sup> | 1,53                    | 8,94 x 10 <sup>2</sup> | 1,76 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 2                         | 5,25 x 10 <sup>2</sup> | 1,05 x 10 <sup>3</sup> | 1,49                    | 8,51 x 10 <sup>2</sup> | 1,61 x 10 <sup>3</sup> | 0,981                   |
| 3                         | 5,07 x 10 <sup>2</sup> | 1,07 x 10 <sup>3</sup> | 1,65                    | 8,23 x 10 <sup>2</sup> | 1,64 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 4                         | 5,18 x 10 <sup>2</sup> | 1,14 x 10 <sup>3</sup> | 1,63                    | 8,37 x 10 <sup>2</sup> | 1,75 x 10 <sup>3</sup> | 1,08                    |
| 5                         | 5,17 x 10 <sup>2</sup> | 1,13 x 10 <sup>3</sup> | 1,61                    | 8,35 x 10 <sup>2</sup> | 1,72 x 10 <sup>3</sup> | 1,07                    |
| 6                         | 5,48 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>3</sup> | 1,46                    | 8,87 x 10 <sup>2</sup> | 1,67 x 10 <sup>3</sup> | 0,974                   |
| 7                         | 5,25 x 10 <sup>2</sup> | 1,10 x 10 <sup>3</sup> | 1,54                    | 8,50 x 10 <sup>2</sup> | 1,69 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 8                         | 4,84 x 10 <sup>2</sup> | 1,05 x 10 <sup>3</sup> | 1,60                    | 7,84 x 10 <sup>2</sup> | 1,60 x 10 <sup>3</sup> | 1,06                    |
| 9                         | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,13 x 10 <sup>3</sup> | 1,58                    | 8,49 x 10 <sup>2</sup> | 1,73 x 10 <sup>3</sup> | 1,05                    |
| 10                        | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,12 x 10 <sup>3</sup> | 1,58                    | 8,49 x 10 <sup>2</sup> | 1,73 x 10 <sup>3</sup> | 1,05                    |
| <b>Média</b>              | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,10 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 8,46 x 10 <sup>2</sup> | 1,73 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                 | 19,2                   | 35,8                   | 5,30 x 10 <sup>-2</sup> | 30,9                   | 57,0                   | 3,50 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 3,68                   | 3,25                   | 3,41                    | 3,66                   | 3,38                   | 3,41                    |
| <b>r</b>                  | 53,9                   | 1,00 x 10 <sup>2</sup> | 0,149                   | 86,6                   | 1,60 x 10 <sup>2</sup> | 9,90 x 10 <sup>-2</sup> |

Tabela C. 2. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's pelo Método A pelo operador 2.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Farnesol (%)            |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 4,75 x 10 <sup>2</sup> | 9,55 x 10 <sup>2</sup> | 1,56                    | 7,20 x 10 <sup>2</sup> | 1,48 x 10 <sup>3</sup> | 1,15                    |
| 2                         | 4,86 x 10 <sup>2</sup> | 9,49 x 10 <sup>2</sup> | 1,51                    | 7,52 x 10 <sup>2</sup> | 1,46 x 10 <sup>3</sup> | 0,998                   |
| 3                         | 4,55 x 10 <sup>2</sup> | 9,52 x 10 <sup>2</sup> | 1,62                    | 7,00 x 10 <sup>2</sup> | 1,46 x 10 <sup>3</sup> | 1,07                    |
| 4                         | 4,72 x 10 <sup>2</sup> | 8,67 x 10 <sup>2</sup> | 1,42                    | 7,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,34 x 10 <sup>3</sup> | 0,945                   |
| 5                         | 4,94 x 10 <sup>2</sup> | 1,02 x 10 <sup>3</sup> | 1,60                    | 7,63 x 10 <sup>2</sup> | 1,57 x 10 <sup>3</sup> | 1,06                    |
| 6                         | 4,97 x 10 <sup>2</sup> | 9,23 x 10 <sup>2</sup> | 1,44                    | 7,63 x 10 <sup>2</sup> | 1,42 x 10 <sup>3</sup> | 0,945                   |
| 7                         | 4,84 x 10 <sup>2</sup> | 9,72 x 10 <sup>2</sup> | 1,56                    | 7,45 x 10 <sup>2</sup> | 1,50 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 8                         | 5,45 x 10 <sup>2</sup> | 1,14 x 10 <sup>3</sup> | 1,62                    | 8,35 x 10 <sup>2</sup> | 1,78 x 10 <sup>3</sup> | 1,08                    |
| 9                         | 5,26 x 10 <sup>2</sup> | 1,18 x 10 <sup>3</sup> | 1,60                    | 8,10 x 10 <sup>2</sup> | 1,67 x 10 <sup>3</sup> | 1,06                    |
| 10                        | 5,39 x 10 <sup>2</sup> | 1,02 x 10 <sup>3</sup> | 1,47                    | 8,27 x 10 <sup>2</sup> | 1,57 x 10 <sup>3</sup> | 0,975                   |
| <b>Média</b>              | 4,97 x 10 <sup>2</sup> | 9,89 x 10 <sup>2</sup> | 1,54                    | 7,64 x 10 <sup>2</sup> | 1,52 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| <b>Sr</b>                 | 29,9                   | 79,5                   | 7,40 x 10 <sup>-2</sup> | 46,0                   | 1,21 x 10 <sup>2</sup> | 5,00 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 6,01                   | 8,04                   | 4,81                    | 6,02                   | 7,95                   | 4,85                    |
| <b>r</b>                  | 83,7                   | 2,22 x 10 <sup>2</sup> | 0,207                   | 1,28 x 10 <sup>2</sup> | 3,38 x 10 <sup>2</sup> | 0,139                   |

Tabela C. 3. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's pelo Método B pelo operador 1.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Farnesol (%)            |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 2,89 x 10 <sup>3</sup> | 1,48 x 10 <sup>3</sup> | 1,59                    | 5,08 x 10 <sup>3</sup> | 2,36 x 10 <sup>3</sup> | 1,05                    |
| 2                         | 2,99 x 10 <sup>3</sup> | 1,44 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,25 x 10 <sup>3</sup> | 2,38 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 3                         | 2,99 x 10 <sup>3</sup> | 1,40 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,26 x 10 <sup>3</sup> | 2,23 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 4                         | 2,77 x 10 <sup>3</sup> | 1,50 x 10 <sup>3</sup> | 1,58                    | 4,83 x 10 <sup>3</sup> | 2,38 x 10 <sup>3</sup> | 1,15                    |
| 5                         | 2,77 x 10 <sup>3</sup> | 1,40 x 10 <sup>3</sup> | 1,54                    | 4,80 x 10 <sup>3</sup> | 2,20 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 6                         | 2,79 x 10 <sup>3</sup> | 1,52 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 4,97 x 10 <sup>3</sup> | 2,41 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 7                         | 2,77 x 10 <sup>3</sup> | 1,48 x 10 <sup>3</sup> | 1,57                    | 4,83 x 10 <sup>3</sup> | 2,30 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 8                         | 3,00 x 10 <sup>3</sup> | 1,43 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,28 x 10 <sup>3</sup> | 2,27 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 9                         | 2,99x 10 <sup>3</sup>  | 1,43 x 10 <sup>3</sup> | 1,57                    | 5,25 x 10 <sup>3</sup> | 2,32 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 10                        | 2,75 x 10 <sup>3</sup> | 1,43 x 10 <sup>3</sup> | 1,58                    | 4,85 x 10 <sup>3</sup> | 2,39 x 10 <sup>3</sup> | 1,04                    |
| <b>Média</b>              | 2,87 x 10 <sup>3</sup> | 1,45 x 10 <sup>3</sup> | 1,57                    | 5,03 x 10 <sup>3</sup> | 2,30 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                 | 1,09 x 10 <sup>2</sup> | 38,9                   | 1,50 x 10 <sup>-2</sup> | 2,12 x 10 <sup>2</sup> | 65,9                   | 1,01 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 3,82                   | 2,69                   | 0,976                   | 4,22                   | 2,86                   | 1,09                    |
| <b>r</b>                  | 3,07 x 10 <sup>2</sup> | 1,09 x 10 <sup>3</sup> | 4,30 x 10 <sup>-2</sup> | 5,94 x 10 <sup>2</sup> | 1,8 x 10 <sup>3</sup>  | 3,20 x 10 <sup>-2</sup> |

Tabela C. 4. Resultados obtidos na determinação de TEC e Farnesol em DEO's pelo Método B pelo operador 2.

| Injeção                   | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | TEC (%)                 | Área Padrão (pA.s)     | Área Amostra (pA.s)    | Farnesol (%)            |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                         | 3,02 x 10 <sup>3</sup> | 1,41 x 10 <sup>3</sup> | 1,51                    | 5,45 x 10 <sup>3</sup> | 2,24 x 10 <sup>3</sup> | 0,980                   |
| 2                         | 3,05 x 10 <sup>3</sup> | 1,50 x 10 <sup>3</sup> | 1,52                    | 5,46 x 10 <sup>3</sup> | 2,41 x 10 <sup>3</sup> | 1,01                    |
| 3                         | 2,82 x 10 <sup>3</sup> | 1,47 x 10 <sup>3</sup> | 1,57                    | 5,07 x 10 <sup>3</sup> | 2,35 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| 4                         | 2,77 x 10 <sup>3</sup> | 1,50 x 10 <sup>3</sup> | 1,62                    | 4,89 x 10 <sup>3</sup> | 2,39 x 10 <sup>3</sup> | 1,18                    |
| 5                         | 4,94 x 10 <sup>3</sup> | 1,35 x 10 <sup>3</sup> | 1,52                    | 4,94 x 10 <sup>3</sup> | 2,12 x 10 <sup>3</sup> | 0,988                   |
| 6                         | 2,87 x 10 <sup>3</sup> | 1,50 x 10 <sup>3</sup> | 1,61                    | 5,06 x 10 <sup>3</sup> | 2,38 x 10 <sup>3</sup> | 1,07                    |
| 7                         | 2,87 x 10 <sup>3</sup> | 1,52 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,31 x 10 <sup>3</sup> | 2,42 x 10 <sup>3</sup> | 1,02                    |
| 8                         | 2,61 x 10 <sup>3</sup> | 1,51 x 10 <sup>3</sup> | 1,63                    | 4,62 x 10 <sup>3</sup> | 2,40 x 10 <sup>3</sup> | 1,08                    |
| 9                         | 2,95 x 10 <sup>3</sup> | 1,47 x 10 <sup>3</sup> | 1,53                    | 5,24 x 10 <sup>3</sup> | 2,34 x 10 <sup>3</sup> | 1,01                    |
| 10                        | 3,00 x 10 <sup>3</sup> | 1,53 x 10 <sup>3</sup> | 1,58                    | 5,37 x 10 <sup>3</sup> | 2,43 x 10 <sup>3</sup> | 1,04                    |
| <b>Média</b>              | 3,09 x 10 <sup>3</sup> | 1,48 x 10 <sup>3</sup> | 1,56                    | 5,14 x 10 <sup>3</sup> | 2,35 x 10 <sup>3</sup> | 1,03                    |
| <b>Sr</b>                 | 6,63 x 10 <sup>2</sup> | 55,0                   | 4,50 x 10 <sup>-2</sup> | 2,74 x 10 <sup>2</sup> | 96,0                   | 3,50 x 10 <sup>-2</sup> |
| <b>CV<sub>r</sub> (%)</b> | 21,5                   | 3,72                   | 2,90                    | 5,32                   | 4,09                   | 3,44                    |
| <b>r</b>                  | 1,56 x 10 <sup>3</sup> | 1,54 x 10 <sup>2</sup> | 0,127                   | 7,66 x 10 <sup>2</sup> | 2,69 x 10 <sup>2</sup> | 9,90 x 10 <sup>-2</sup> |

**Anexo D.** Distribuição F de Snedecor com grau de significância de 5% [48].

TABLE A4 Values of  $F_{.05,n,m}$

| <b><i>m</i> = Degrees<br/>of Freedom<br/>for<br/>Denominator</b> | <b><i>n</i> = Degrees of Freedom<br/>for Numerator</b> |          |          |          |          |
|--|--|----------|----------|----------|----------|
|  | <b>1</b>   | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> |
| 1  | 161  | 200      | 216      | 225      | 230      |
| 2  | 18.50  | 19.00    | 19.20    | 19.20    | 19.30    |
| 3  | 10.10  | 9.55     | 9.28     | 9.12     | 9.01     |
| 4  | 7.71   | 6.94     | 6.59     | 6.39     | 6.26     |
| 5  | 6.61   | 5.79     | 5.41     | 5.19     | 5.05     |
| 6  | 5.99   | 5.14     | 4.76     | 4.53     | 4.39     |
| 7  | 5.59   | 4.74     | 4.35     | 4.12     | 3.97     |
| 8  | 5.32   | 4.46     | 4.07     | 3.84     | 3.69     |
| 9  | 5.12   | 4.26     | 3.86     | 3.63     | 3.48     |
| 10   | 4.96   | 4.10     | 3.71     | 3.48     | 3.33     |
| 11   | 4.84   | 3.98     | 3.59     | 3.36     | 3.20     |
| 12   | 4.75   | 3.89     | 3.49     | 3.26     | 3.11     |
| 13   | 4.67   | 3.81     | 3.41     | 3.18     | 3.03     |
| 14   | 4.60   | 3.74     | 3.34     | 3.11     | 2.96     |
| 15   | 4.54   | 3.68     | 3.29     | 3.06     | 2.90     |
| 16   | 4.49   | 3.63     | 3.24     | 3.01     | 2.85     |
| 17   | 3.45   | 3.59     | 3.20     | 2.96     | 2.81     |
| 18   | 4.41   | 3.55     | 3.16     | 2.93     | 2.77     |
| 19   | 4.38   | 3.52     | 3.13     | 2.90     | 2.74     |
| 20   | 4.35   | 3.49     | 3.10     | 2.87     | 2.71     |
| 21   | 4.32   | 3.47     | 3.07     | 2.84     | 2.68     |
| 22   | 4.30   | 3.44     | 3.05     | 2.82     | 2.66     |
| 23   | 4.28   | 3.42     | 3.03     | 2.80     | 2.64     |
| 24   | 4.26   | 3.40     | 3.01     | 2.78     | 2.62     |
| 25   | 4.24   | 3.39     | 2.99     | 2.76     | 2.60     |