

Validação da curva de calibração (linearidade e homocedasticidade) do α -pineno por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC) no óleo essencial de *Schinus Terebenthifolius* Raddi**Validation of the calibration curve (linearity and homocedasticity) of α -pinene by gas chromatography with flame ionization detection (CG-DIC) in the essential oil of *Schinus Terebenthifolius* Raddi**

DOI:10.34117/bjdv6n10-656

Recebimento dos originais: 13/09/2020

Aceitação para publicação: 29/10/2020

Gleice Carolina Santos Cruz

Mestre em Vigilância Sanitária

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS.

Endereço: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, 21040-900, Brasil

Francielle Daiane Lopes Luna

Graduação em Matemática

Bolsista FAPERJ

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

Laboratório de Análises Química e Biológica (LAQB)

Endereço: Avenida Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, 23070-200, Brasil.

Rafaella Cruz De Azevedo Silva

Mestre em Ciências

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos

Laboratório de Métodos Analíticos e Espectrometria de Massas (LACEM)

Endereço: Avenida Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

Adélia Mara Belem Lima

Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem - CENABIO, Unidade de Microscopia Avançada.

Endereço: Av Carlos Chagas Filho, 373 - Bloco M, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brasil..

Marcelo Raul Romero Tappin

Doutor em Ciências

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos

Laboratório de Métodos Analíticos e Espectrometria de Massas (LACEM)

Endereço: Avenida Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

Glaucio Diré Feliciano

Doutorado em Biologia (Biociências Nucleares)

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

Laboratório de Análises Química e Biológica (LAQB)

Endereço: Avenida Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, 23070-200, Brasil.

Alaide De Sá Barreto

Doutor em Ciências – Química Orgânica

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO

Laboratório de Análises Química e Biológica (LAQB)

Endereço: Avenida Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, 23070-200, Brasil.

E-mail: alaidesa@uezo.rj.gov.br

RESUMO

A espécie *Schinus terebenthifolius* Raddi. (Aroeira) é bastante conhecida por apresentar diversas atividades biológicas. Alguns autores descrevem que o α - pineno é o componente majoritário presente no óleo essencial dos frutos de *S. terebenthifolius*. Apesar da importância econômica e biológica do α - pineno verificamos na literatura a ausência de métodos analíticos que validem intralaboratorial, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado a função de calibração. Este trabalho teve como objetivo avaliação de linearidade e homocedasticidade através da preparação de três curvas de calibração em três dias distintos afim de verificar possíveis diferenças de comportamento linear do α -pineno, do óleo essencial de *S. terebenthifolius*, com variação diária da análise, um dos requisitos mínimos para a validação de métodos analíticos. Verificamos que porcentagem do α -pineno presente neste óleo essencial foi de 25,4 % \pm 0,7. O teste de Levene indicou homogeneidade duvidosa dos dados do segundo dia e variâncias constantes no primeiro e terceiro dia de análise. A distribuição de probabilidade apresentou-se normal somente para o primeiro dia de avaliação. A regressão se mostrou significativa para os três dias de avaliação. Verificamos também que a linearidade foi comprovada na faixa de concentração avaliada, porém através do modelo linear obtido pelo MMQP. Concluímos que para cada dia de avaliação do óleo essencial deve-se preparar uma curva de calibração para quantificação do α - pineno, devido a significância estatística do intercepto em um dos três dias de avaliação.

Palavras chaves: *Schinus terebenthifoli*, Óleo essencial, CG/DIC, α -pineno, validação.

ABSTRACT

The species *Schinus terebenthifolius* Raddi. (Aroeira) is well known for presenting several biological activities. Some authors describe that α -pinene is the major component present in the essential oil of *S. terebenthifolius* fruits. Despite the economic and biological importance of α -pinene, we found in the literature the absence of analytical methods that validate intralaboratory, under different conditions, in a justified interval of time for the calibration function. This work aimed to evaluate linearity and homoscedasticity by preparing three calibration curves in three different days in order to verify possible differences in linear behavior of α -pinene, of the essential oil of *S. terebenthifolius*, with daily variation of the analysis, a minimum requirements for the validation of analytical methods. We found that the percentage of α -pinene present in this essential oil was 25.4% \pm 0.7. Levene's test indicated doubtful homogeneity of data on the second day and constant variances on the first and third days of analysis. The probability distribution was normal only for the first day of assessment. The regression was significant for the three days of evaluation. We also verified that the linearity was proven in the evaluated concentration range, however through the linear model obtained by MMQP. We conclude that for each evaluation day of the essential oil, a calibration curve must be prepared to quantify α -pinene, due to the statistical significance of the intercept on one of the three evaluation days.

Keywords: *Schinus terebenthifolius*, Essential oil, GC/FID, α -pinene, validation.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais e/ ou produtos derivados são empregados, industrialmente, como matérias-primas, insumos ou aditivos para as indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, produtos de higiene e limpeza e cosmética (SEBRAE, 2020; IBGE, 2020 GOMES et al., 2013). Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante (CLEMENTE, 2006; DEGÁSPARI *et al.*, 2005), uso veterinário (ARAUJO, 2010), propriedades sensoriais, entre outras (FRANZ, 2010; BIZZO et al., 2009).

As folhas e frutos da espécie *Schinus terebenthifolius*, por exemplo, é rica em óleos essenciais (GOMES et al., 2013; MATSUO, 2011; SILVA, 2010; SILVA et al., 2011; CLEMENTE, 2006; DEGÁSPARI *et al.*, 2005; CHOWDHURY & TRIPANI, 2001; SINGH et al., 1998;) e o preço destes é elevado (US\$800,00/L). Os óleos essenciais de *Schinus terebenthifolius* apresentam ação antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, cicatrizante, entre outras. Muitas destas atividades já foram comprovadas cientificamente (DEGÁSPARI *et al.*, 2005). No entanto, apesar desta espécie apresentar uma grande dispersão no solo brasileiro, o custo do óleo ser elevado, poucas empresas no país o produzem. Isto se deve à falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos essenciais e baixos investimentos governamentais no setor, o que dificulta a sua comercialização (SEBRAE, 2020; BIALOSKORSKI NETO, 2009).

Matsuo (2011) e Silva (2011) descrevem em seus respectivos trabalhos que o α - pineno é o componente majoritário presente no óleo essencial dos frutos de *S. terebenthifolius*. Já Dos Santos et al 2007 verificaram através da análise química mensal três exemplares (A, B e C) a presença de compostos químicos majoritários distintos (A o sabineno, o B o α -pineno e cariofileno e o C, α - pineno e germacreno-D). Como todos esses exemplares se encontravam numa mesma região (Serra Gaúcha), a distâncias de cerca de 50m e são nativas espontâneas, os autores propuseram que os exemplares estudados pertenciam a dois quimiotipos (QT), são eles o: QT sabineno, representado pelo exemplar A e QT pineno germacreno-D, representado pelos exemplares B e C (DOS SANTOS et al., 2007).

Estudos demonstraram que o α - pineno apresenta efeito neuroprotetor em rato adultos machos Wistar com acidente vascular cerebral isquêmico através da atenuação da neuroinflamação e inibição da apoptose (KHOSHNAZAR, PARVARDEH & BIGDELI, 2020), ação antiinflamatória por meio da supressão de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em macrófagos peritoneais de camundongos (KIM et al., 2015), ação tripanomicida (SARTORELLI et al., 2012) e atividade antimicrobiana e neuroprotetora em neuroblastomas humanos, capaz de afetar o metabolismo energético de mitocôndrias isoladas através de pelo menos dois mecanismos, sendo eles o desacoplamento da fosforilação oxidativa ou

inibição da cadeia transportadora de elétrons (COWAN, 1999; ABRAHIM et al., 2003; CHANG et al., 2007).

Apesar da importância econômica e biológica do alfa pineno verificamos na literatura a ausência de métodos analíticos que validem intralaboratorial a função de calibração, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado. Vale ressaltar que a validação por procedimentos interlaboratoriais é estabelecida por meio de estudos colaborativos. Contudo, esses estudos não são capazes de acompanhar a demanda por garantia de qualidade, a produção da fábrica e a velocidade dos avanços técnicos e científicos. Estas limitações das validações interlaboratoriais por estudos colaborativos têm direcionado os laboratórios à adoção de procedimentos para validação intralaboratorial. Hoje a validação intralaboratorial é considerada apropriada para avaliar parâmetros de desempenho de um método (BRASIL, 2015; SOUZA et al., 2007). Além disso, a comunidade científica internacional reconhece a validação intralaboratorial como alternativa quando não se há disponibilidade de procedimento interlaboratorial ou quando os procedimentos não são aplicáveis (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Diante do exposto o presente trabalho objetiva a avaliação de linearidade e homocedasticidade através da preparação de três curvas de calibração em três dias distintos afim de verificar possíveis diferenças de comportamento linear do α -pineno, presente no óleo essencial de *S. terebenthifollius*, com variação diária da análise, um dos requisitos mínimos para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017; BRASIL, 2015) para a empresa Laszlo Ind. e Com. Ltda, localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

O óleo essencial de *Schinus terebenthifollius* Raddi foi doado pela empresa Laszlo Ind. e Com. Ltda, localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais. Parte do óleo essencial (10 mL; OE-1) foi acondicionado, hermeticamente, em frasco âmbar, enviado para o nosso Laboratório.

2.2 ANÁLISE EM CG-DIC E CG-EM

As análises por cromatografia gasosa com Detector de Ionização em Chama e sistema de injeção automático (CG-DIC) e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) foram realizadas em triplicata na Plataforma de Métodos Analíticos (PMA) da Fundação Oswaldo Cruz - Farmanguinhos. Utilizou-se o CG-DIC da marca Shimadzu, modelo GC-6890 e coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30cm x 0,25mm d.i., 0,25 μ m de espessura do filme). O Hélio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 40° (10min) a 260° a 3°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de

270°C e 280°C, respectivamente. Utilizou-se um CG-EM da marca Shimadzu, modelo QP-5000-Quadrupole e EM operando com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 mm x 0,25 mm d.i., 0,25 µM de espessura do filme. O hélio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 1mL/min com Split. As temperaturas do injetor e do detector foram de 270 °C e 280 °C, respectivamente. As temperaturas do forno, do injetor e do detector foram as mesmas utilizadas no CG – DIC.

Os componentes foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₇-C₃₀) injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura (ADAMS, 2001).

A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise em sistema de cromatografia em fase gasosa (VIEGAS & BASSOLI, 2007).

2.3 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DA HOMOCEASTICIDADE DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A avaliação da linearidade foi conduzida, similarmente, aos procedimentos propostos por Souza e Junqueira (2005) exceto ao teste utilizado na normalidade da distribuição. Souza e Junqueira (2005) utilizou o teste de Ryan-Jonier ao invés do teste Shapiro-Wilk. O teste de Ryan-Jonier é similar ao potente teste de Shapiro-Wilk. Este último é um teste estatístico formal que abrange testes de hipóteses e propõe um teste de normalidade baseado na correlação linear entre as estatísticas observadas ordenadas e os valores esperados em uma distribuição normal, publicado em uma tabela de valores críticos.

Para avaliação da linearidade do método foi feita análise em quadruplicata de cinco concentrações diferentes de α - pineno (100, 200, 300, 400 e 500 µg/ mL). Foram preparadas três curvas de calibração em três dias distintos para verificação de possíveis diferenças de comportamento linear com variação do dia da análise (BRASIL, 2017; BRASIL, 2015, ICH Q2(R1), 2005; RIBANI et al., 2004; LEITE, 2002). A análise estatística dos dados foi efetuada através do *software Statistica*[®]. As soluções padrão utilizadas na verificação foram preparadas a partir de uma solução mãe contendo padrão de α - pineno (Sigma Aldrich, Lote: 80796DJV) em concentração de 5000,00 mg/ mL. O padrão α - pineno e OE-1 foram pesados em balança analítica, Sartorius modelo CP225D, as soluções padrão foram preparadas em balões volumétricos (5, 10, 25, 50 e 100mL) e pipetas volumétricas (1 a 5 mL) calibrados. O solvente de diluição das soluções foi o diclorometano (Tedia, Lote: 912167R). As concentrações das soluções padrão para injeção foram de 100, 200, 300,

400 e 500 µg/ mL de α -pineno. O preparo das amostras para a quantificação foi realizado com uma diluição do OE-1 em diclorometano. A concentração da solução amostra para injeção foi de aproximadamente 10 mg/ mL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos constituintes presentes no óleo essencial de *Schinus terebenthifolius* Raddi (1,5 mL) foi efetuada através da comparação de seus espectros de massa com as bases de dados do sistema do equipamento do CG-EM. A figura 1 apresenta o Cromatograma dos íons totais do óleo essencial da espécie *Schinus terebenthifolius*. O perfil cromatográfico do óleo essencial apresentou maior composição de monoterpenos em relação aos sesquiterpenos e terpenos bicíclicos. O constituinte majoritário encontrado foi o α -pineno (Figura 1, Tabela 1).

Figura 1. Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *S. terebenthifolius*

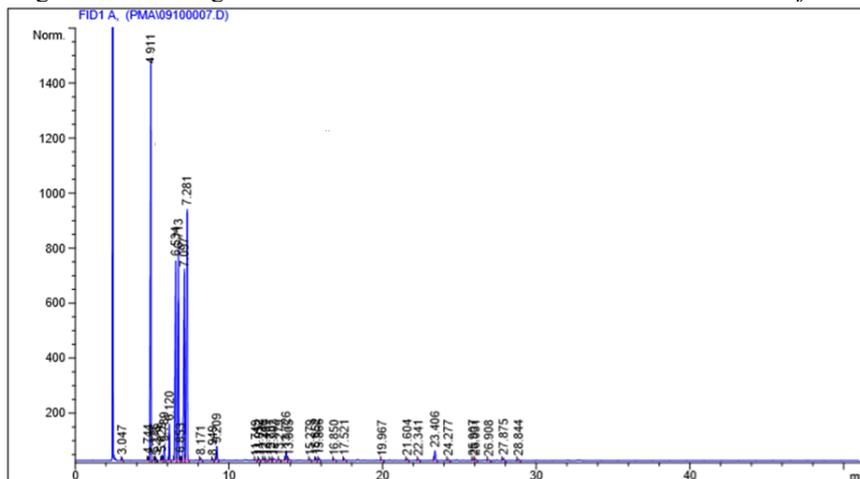


Tabela 1. Composição do óleo essencial de *Schinus terebenthifolius*. O *IK corresponde ao Índice de Kovats da literatura e a % aos valores normalizados das áreas.

Substancias	IK _i	%
α - pineno	939	23.66876
canfeno	953	2.20185
α -careno	1011	15.69855
α - terpineno	1018	14.81860
acetofenona	1182	15.69865
Acetato de trans verbenila	1292	20.08032
trans cariofileno	1404	1.04626
Total=		93,21299

*(ADAMS, 2001)

Matsuo (2011) e Silva, (2011) descreveram em seus respectivos trabalhos que o α -pineno é o componente majoritário presente no óleo essencial de aroeira (*S. terebenthifolius*), juntamente,

com o limoneno e o mirceno. Pawlowski et al. (2012) e Silva et al. (2010), demonstraram também a predominância dos monoterpenos nos óleos essenciais de aroeira destacando-se como constituinte majoritário o α -pineno, com percentuais de 31,59% e 22,56%, respectivamente.

Ribeiro (2015), Cole et al., (2014), Gehrke (2012) e Clemente (2006) identificaram o delta-careno como constituinte majoritário no óleo essencial dos frutos. No Brasil foram realizados um estudo, com 15 ecotipos de *S. terebenthifolius*. (GOMES et al., 2013). Os autores observaram que houve diferença significativa entre os indivíduos, com variação para o rendimento dos óleos essenciais e no constituinte majoritário. Eles observaram a formação de seis grupos, sendo dois deles formados por indivíduos com maior concentração de α -pineno, α -felandreno, o-cimeno, limoneno e β -felandreno (GOMES et al., 2013). A variação química observada para os componentes majoritários podem estar relacionadas à diferenças genotípicas, ontogênicas e ambientais (estação do ano, as condições geográficas, o período de colheita, a técnica de extração empregada entre outros), incluindo estresses bióticos e abióticos (MACIEL et al., 2002; SANGWAN et al., 2001). Já Dos Santos et al 2007 verificaram através da análise química mensal a presença de compostos químicos majoritários distintos nos três exemplares (A, B e C) estudados, são eles: A o sabineno, B o α -pineno e cariofileno e o C, α -pineno e germacreno-D. A análise estatística mostrou que não houve variação da composição química do óleo essencial, para um mesmo exemplar, durante os meses de coleta. A análise estatística comprovou diferenças químicas entre os três exemplares estudados, quando comparados entre si em todos os meses avaliados (DOS SANTOS et al., 2007). Vale ressaltar que todos os acessos a esses exemplares se encontravam numa mesma região (Serra Gaúcha), a distâncias de cerca de 50m, portanto em condições ambientais e solo idênticos e são nativas espontâneas, consideradas como parte do grupo das pioneiras. Logo, os autores propuseram que os exemplares estudados pertenciam a dois quimiotipos (QT), são eles o: QT sabineno, representado pelo exemplar A e QT pineno germacreno-D, representado pelos exemplares B e C (DOS SANTOS et al., 2007).

Neste trabalho observamos que a porcentagem do α -pineno presente no OE-1 foi 25,4 % \pm 0,7. Essa composição química é compatível com os dados da literatura para constituintes voláteis de *Schinus terebenthifolius* (GOMES et al 2013; MATSUO, 2011; SILVA, 2011). Possivelmente, trata-se de um quimiotipo (DOS SANTOS et al., 2007) ou resultado das ações dos interferentes ambientais bióticos e abióticos (BARBOSA et al., 2010; SANGWAN et al., 2001; MACIEL et al. 2002).

A avaliação da função de calibração foi efetuada através da construção de três curvas de calibração com cinco níveis (Tabela 2 - 6), em quadruplicata com a injeção em três dias distintos. As concentrações foram 100, 200, 300, 400 e 500 μ g/ mL de α -pineno. Toda a avaliação estatística

encontra-se nas Tabelas 2 – 6. As figuras 2 -4 correspondem aos gráficos referentes às avaliações estatísticas.

Tabela 2. Avaliação estatística das curvas de calibração para α -pineno (MMQO)

Testes	Curva 1 PRIMEIRO DIA (08/11)	Curva 2 SEGUNDO DIA (12/11)	Curva 3 TERCEIRO DIA (14/11)
	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=4, N=20)	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=4, N=20)	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=4, N=20)
Avaliação de homogeneidade das variâncias - Levene Test $p \leq 0,05$ - variâncias não constantes $0,05 < p \leq 0,1$ - homogeneidade duvidosa $p > 0,1$ - variâncias constantes	$p = 0,396489$ Variâncias constantes	$p = 0,050965$ Homogeneidade duvidosa	$p = 0,279201$ Variâncias constantes
Equação da reta	$b_0 = 1,021803$ $b_1 = 0,695474$	$b_0 = 2,279748$ $b_1 = 0,682292$	$b_0 = 2,577304$ $b_1 = 0,692353$
Avaliação da significância do parâmetro b_0 $p \leq 0,05$ - intercepto estatisticamente significativo	$p = 0,316254$ Não significativo	$p = 0,298641$ Não Significativo	$p = 0,111343$ Não significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 $p \leq 0,05$ - regressão estatisticamente significativa	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	0,991202	2,130073	1,539260
Erro padrão b_1	0,002936	0,006279	0,004539
R^2	0,99967937	0,99847775	0,99922684
R^2 ajustado	0,99966155	0,99839318	0,99918388
Erro padrão da estimativa	1,8901	4,0619	2,9353
Avaliação da distribuição dos resíduos (Teste de normalidade) - Shapiro-Wilk's $p \leq 0,05$ - distribuição não normal dos resíduos	$p = 0,16942$ Distribuição normal	$p = 0,03334$ Distribuição não normal	$p = 0,02860$ Distribuição não normal
Avaliação de outliers pelo teste de Grubbs ($\alpha=0,05$; k=5, n=4, 1,46)	Sem outliers	2 outliers (1 e 17)	1 outlier (14)
Avaliação de autocorrelação dos resíduos Estatística de Durbin-Watson - para K=2 e N=20 d_L tab.=1,201 e d_U tab.=1,411 a 5% Avaliação da autocorrelação positiva: $d < d_L$ - resíduos positivamente autocorrelacionados $d_L \leq d \leq d_U$ - teste inconclusivo $d > d_U$ - resíduos não positivamente autocorrelacionados Avaliação da autocorrelação negativa: $(4-d) < d_L$ - resíduos negativamente autocorrelacionados $d_L \leq (4-d) \leq d_U$ - teste inconclusivo $(4-d) > d_U$ - resíduos não negativamente autocorrelacionados	$d = 2,376676$ Serial corr. = -0,194479 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados	$d = 2,022469$ Serial corr. = -0,026061 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados	$d = 1,947958$ Serial corr. = 0,019916 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados

Tabela 3. Avaliação estatística das curvas de calibração para α -pineno com exclusão de *outliers* (MMQO).

Testes	Curva 2 SEGUNDO DIA (12/11)	Curva 3 TERCEIRO DIA (14/11)
	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=4, N=18)	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=4, N=19)
Avaliação de homogeneidade das variâncias – Brown-Forsythe Test $p \leq 0,05$ – variâncias não constantes $0,05 < p \leq 0,1$ - homogeneidade duvidosa $p > 0,1$ - variâncias constantes	$p = 0.058421$ Homogeneidade duvidosa	$p = 0.346426$ Variâncias constantes
Equação da reta	$b_0 = 1.673071$ $b_1 = 0.686413$	$b_0 = 2.545819$ $b_1 = 0.692661$
Avaliação da significância do parâmetro b_0 $p \leq 0,05$ – intercepto estatisticamente significativo	$p = 0.415947$ Não Significativo	$p = 0.125152$ Não significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 $p \leq 0,05$ – regressão estatisticamente significativa	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	2.003390	1.578311
Erro padrão b_1	0.005966	0.004711
R^2	0.99879262	0.99921416
R^2 ajustado	0.99871716	0.99916794
Erro padrão da estimativa	3.4520	3.0060
Avaliação da distribuição dos resíduos (Teste de normalidade) - Shapiro-Wilk's $p \leq 0,05$ – distribuição não normal dos resíduos	$p = 0.00888$ Distribuição não normal	$p = 0.02585$ Distribuição não normal
Avaliação de autocorrelação dos resíduos Estatística de Durbin-Watson – para $K=2$ e $N=20$ d_L tab.=1.201 e d_U tab.=1.411 a 5% Avaliação da autocorrelação positiva: $d < d_L$ – resíduos positivamente autocorrelacionados $d_L \leq d \leq d_U$ - teste inconclusivo $d > d_U$ - resíduos não positivamente autocorrelacionados Avaliação da autocorrelação negativa: $(4-d) < d_L$ - resíduos negativamente autocorrelacionados $d_L \leq (4-d) \leq d_U$ - teste inconclusivo $(4-d) > d_U$ – resíduos não negativamente autocorrelacionados	$d = 1.794170$ Serial corr. = 0.099834 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados	$d = 1.709506$ Serial corr. = 0.140294 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados

Tabela 4. Avaliação estatística das curvas de calibração para α -pineno (MMQP).

Testes	Curva 1	Curva 2	Curva 3
	PRIMEIRO DIA (08/11)	SEGUNDO DIA (12/11)	TERCEIRO DIA (14/11)
	Dados brutos regressão linear ponderada (k=5, n=4, N=20)	Dados brutos regressão linear ponderada (k=5, n=4, N=20)	Dados brutos regressão linear ponderada (k=5, n=4, N=20)
Equação da reta	$b_0 = 1.454900$ $b_1 = 0.694056$	$b_0 = 2.249921$ $b_1 = 0.682390$	$b_0 = 2.293002$ $b_1 = 0.693280$
Avaliação da significância do parâmetro b_0 $p \leq 0,05$ – intercepto estatisticamente significativo	$p = 0.051846$ Não significativo	$p = 0.106812$ Não Significativo	$p = 0.039758$ Estatisticamente significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 $p \leq 0,05$ – regressão estatisticamente significativa	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	0.698669	1.325385	1.034404
Erro padrão b_1	0.002678	0.005056	0.003947
R^2	0.99973215	0.99901290	0.99941680
R^2 ajustado	0.99971727	0.99895807	0.99938440
Erro padrão da estimativa	0.10876	0.20583	0.16067
Avaliação de <i>outliers</i> da regressão (Resíduos padronizados)	Sem <i>outliers</i>	Sem <i>outliers</i>	Sem <i>outliers</i>

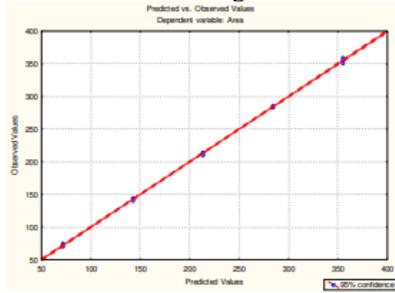
Tabela 5. Avaliação estatística da curva global de calibração para o α -pineno (MMQO).

Testes	Curva global
	Dados brutos regressão linear ordinária (k=5, n=12, N=60)
Avaliação de homogeneidade das variâncias - Levene Test $p \leq 0,05$ – variâncias não constantes $0,05 < p \leq 0,1$ – homogeneidade duvidosa $p > 0,1$ - variâncias constantes	$p = 0.098468$ Homogeneidade duvidosa
Equação da reta	$b_0 = 1.968206$ $b_1 = 0.690003$
Avaliação da significância do parâmetro b_0 $p \leq 0,05$ – intercepto estatisticamente significativo	$p = 0.063769$ Não Significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 $p \leq 0,05$ – regressão estatisticamente significativa	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	1.041420
Erro padrão b_1	0.003075
R^2	0.99884926
R^2 ajustado	0.99882942
Erro padrão da estimativa	3.4397
Avaliação da distribuição dos resíduos (Teste de normalidade) - Shapiro-Wilk's $p \leq 0,05$ – distribuição não normal dos resíduos	$p = 0.00004$ Distribuição não normal
Avaliação de <i>outliers</i> da regressão (resíduos padronizados)	2 <i>outliers</i> (41 e 53)
Avaliação de autocorrelação dos resíduos Estatística de Durbin-Watson – para $K=2$ e $N=60$ d_L tab.=1.549 e d_U tab.=1.616 a 5% Avaliação da autocorrelação positiva: $d < d_L$ resíduos positivamente autocorrelacionados $d_L \leq d \leq d_U$ teste inconclusivo $d > d_U$ – resíduos não positivamente autocorrelacionados Avaliação da autocorrelação negativa: $(4-d) < d_L$ – resíduos negativamente autocorrelacionados $d_L \leq (4-d) \leq d_U$ - teste inconclusivo $(4-d) > d_U$ – resíduos não negativamente autocorrelacionados	$d = 2.117340$ Serial corr. = -0.065232 Resíduos não positivamente ou negativamente correlacionados

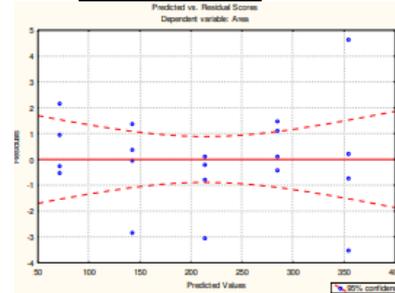
Tabela 6. Avaliação estatística da curva global de calibração para α -pineno (MMQP)

Testes	Curva global – MMQP
	Dados brutos regressão linear ponderada (k=5, n=12, N=58)
Equação da reta	$b_0 = 2.001998$ $b_1 = 0.689893$
Avaliação da significância do parâmetro b_0 $p \leq 0,05$ – intercepto estatisticamente significativo	$p = 0.004008$ Estatisticamente Significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 $p \leq 0,05$ – regressão estatisticamente significativa	$p < 0,000001$ Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	0.667993
Erro padrão b_1	0.002552
R^2	0.99920670
R^2 ajustado	0.99919303
Erro padrão da estimativa	0.17983
Avaliação de <i>outliers</i> da regressão (Resíduos padronizados)	Sem <i>outliers</i>

Figura 2. Gráficos das avaliações feitas no PRIMEIRO DIA



Valores previstos x observados para os dados da curva.



Valores previstos x resíduos para os dados da curva

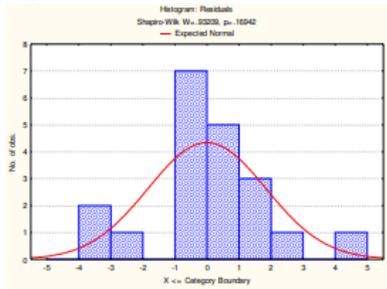
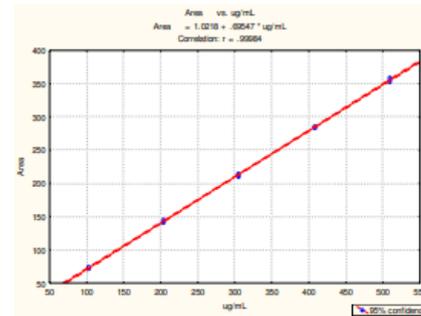
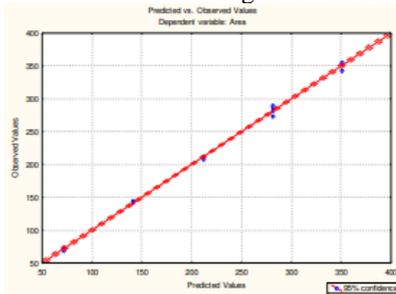


Gráfico de distribuição de probabilidade para os dados da curva

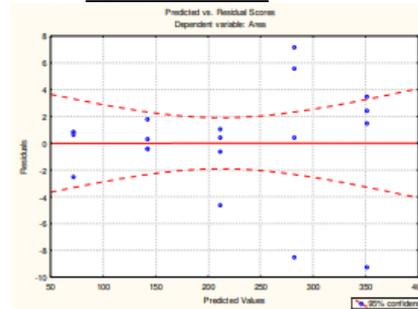


Função de calibração para os dados da curva

Figura 3. Gráficos das avaliações feitas no SEGUNDO DIA



Valores previstos x observados para os dados da curva.



Valores previstos x resíduos para os dados da curva

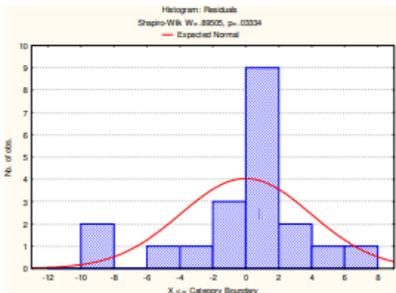
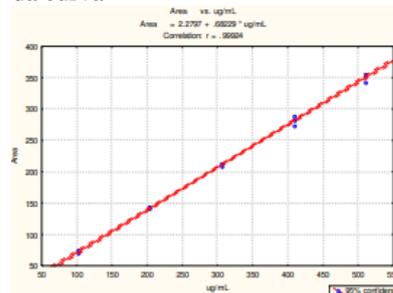
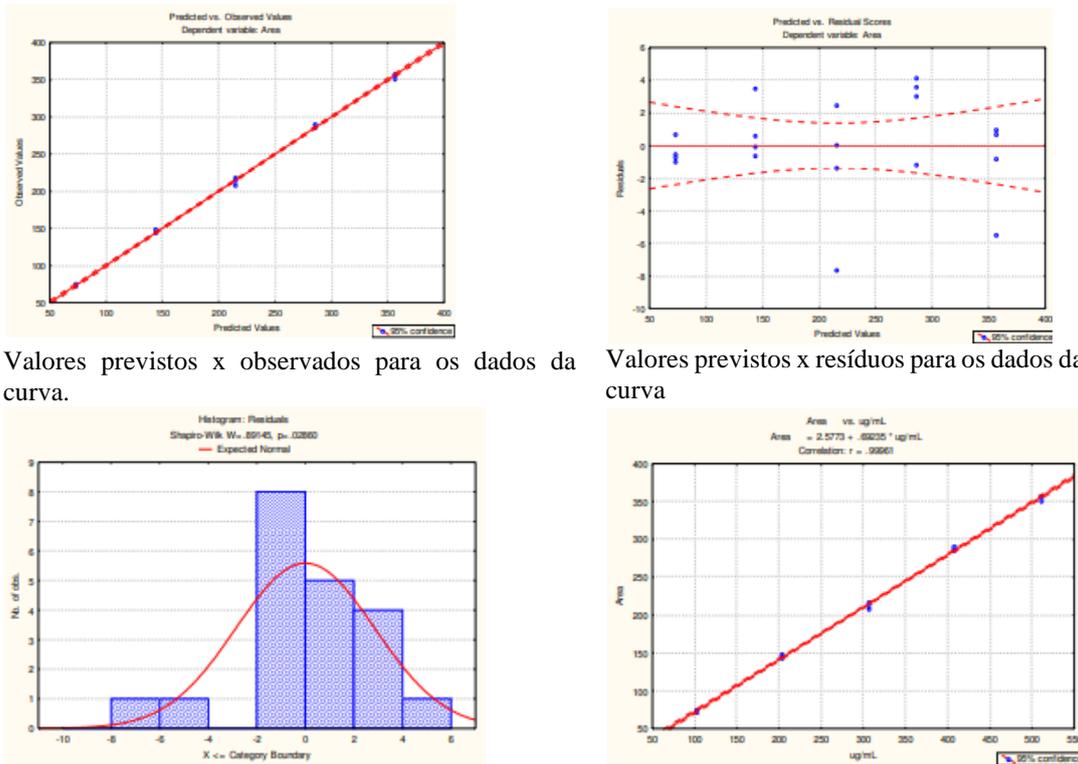


Gráfico de distribuição de probabilidade para os dados da curva



Função de calibração para os dados da curva

Figura 4. Gráficos das avaliações feitas no TERCEIRO DIA

Valores previstos x observados para os dados da curva.

Valores previstos x resíduos para os dados da curva

Gráfico de distribuição de probabilidade para os dados da curva

Função de calibração para os dados da curva

As análises estatísticas dos dados iniciaram-se pela avaliação da presença de valores aberrantes em cada conjunto de repetições em cada nível de concentração empregando-se a verificação de *outliers* através do teste de Grubbs a $\alpha = 0.05$, supondo-se que os dados são provenientes de uma distribuição normal. Foram observados outliers em dois dias de preparação das curvas de calibração e estas observações foram retiradas do grupo de resultados.

Os testes utilizados para a avaliação da homogeneidade das variâncias foram os testes de Levene (teste paramétrico menos sensível à premissa de normalidade), aplicados aos dados brutos sem exclusão de observações (LEVENE, 1960) e o de Brown & Forsythe, teste não paramétrico que corresponde a uma modificação do teste de Levene, aplicado nos casos de exclusão de resultados pela avaliação de outliers (BROWN & FORSYTHE, 1974a, 1974b).

O teste de Levene indicou homogeneidade duvidosa dos dados do segundo dia e variâncias constantes no primeiro e terceiro dia. Entretanto, nos dois últimos dias, foram observados outliers que foram retirados e reavaliados pelo teste de Brown & Forsythe (ALMEIDA et al., 2008), apresentando a mesma avaliação.

A distribuição de probabilidade dos resíduos da regressão foi avaliada nos três dias e apresentaram uma distribuição de probabilidade normal somente para o primeiro dia de avaliação,

utilizando como critério o teste para verificação da normalidade de Shapiro-Wilk's (BUSSAB et al., 2003; ROYSTON, 1983).

Os desvios consideráveis da normalidade podem ser devidos à presença de dados aberrantes e à falta de ajuste do modelo. As opções para uma distribuição não normal é efetuar uma transformação de variáveis ($\sqrt{\quad}$, log, inverso, etc) ou usar o método dos mínimos quadrados generalizados. A autocorrelação dos resíduos foi avaliada pela estimativa d de Durbin-Watson e os resíduos não apresentaram autocorrelação positiva ou negativa. Quando os resíduos estão autocorrelacionados a regressão linear ordinária não é adequada e pode-se tanto efetuar uma transformação de variáveis ($\sqrt{\quad}$, log, inverso, etc) quanto empregar-se o método dos mínimos quadrados generalizados (BUSSAB et al., 2003).

A avaliação da significância do intercepto foi adequada, pois se mostrou não significativo nos três dias. Se o intercepto é estatisticamente significativo, a hipótese de que ele seja igual a zero é rejeitada e a reta não passa pela origem. Isso equivale a dizer que existem evidências estatísticas a um nível de significância de 0,05 de que o verdadeiro intercepto não caia dentro dos limites do intervalo de confiança e que o sistema apresenta vício ou viés.

Entretanto, a regressão se mostrou significativa para os três dias de avaliação. Se o coeficiente angular é significativo, a hipótese de que ele seja igual a zero é rejeitada, ou seja, a regressão é significativa. Caso contrário, a não rejeição da hipótese nula decorre de duas possibilidades: a variável x não explica a variação de y ou a relação entre y e x não é linear (BUSSAB et al., 2003).

Como pode ser observado na Tabela 2, em dois dias houve uma violação das premissas para ajuste dos dados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), indicando que um ajuste mais adequado deve ser obtido pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), o que de fato pôde ser constatado pelos menores erros padrão das estimativas, obtidos pelas equações ajustadas com ponderação.

Na Tabela 6 observa-se também a violação das premissas quando avaliados os dados na equação global pelo MMQO. A RDC 166 (BRASIL, 2017) informa que a linearidade qualifica o procedimento analítico em obter resposta que seja diretamente proporcional a concentração do analito na amostra. Se o método for considerado linear, os resultados são proporcionais à concentração da amostra no intervalo determinado analisado. Diante do exposto verificamos que a linearidade foi comprovada na faixa de concentração avaliada por MMQP. A equação da reta global encontra-se na Tabela 6.

4 CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico do óleo essencial de *Schinus terebenthifollius* Raddi apresentou maior composição de monoterpenos em relação aos sesquiterpenos e terpenos bicíclicos. O constituinte majoritário encontrado foi o α -pineno. A porcentagem do α -pineno presente no óleo essencial foi de 25,4 % \pm 0,7. Vale ressaltar que a literatura descreve, além do α - pineno, outros componentes monoterpenos majoritários. Possivelmente, os espécimes utilizados na obtenção do óleo essencial pela empresa Laszlo, consiste em um quimiotipo ou resultado das ações dos interferentes ambientais bióticos e abióticos. Esta variação química observada para os componentes majoritários que podem ocorrer em diferentes regiões, reforçam a importância de estudos com essa espécie em nível regional.

O teste de Levene indicou homogeneidade duvidosa dos dados do segundo dia e variâncias constantes no primeiro e terceiro dia. A distribuição de probabilidade apresentou-se normal somente para o primeiro dia de avaliação. A regressão se mostrou significativa para os três dias de avaliação. Verificamos também que a linearidade foi comprovada na faixa de concentração avaliada, porém através do modelo linear obtido pelo MMQP. Observamos que para cada dia de avaliação do óleo essencial deve-se preparar uma curva de calibração para quantificação do α - pineno, devido a significância estatística do intercepto em um dos três dias de avaliação. Como trata-se de uma validação preliminar ainda são necessários resultados que avaliem o efeito matriz, seletividade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação e os limites de detecção e quantificação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa Laszlo Ind. e Com. LTDA pela doação do óleo essencial e a FAPERJ pelas bolsas concedidas.

REFERENCIAS

- ABRAHIM, D., FRANCISCHINI, A.C., PERGO, E.M., KELMER-BRACHT, A.M., ISHIIWAMOTO, E.L. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 985-991, 2003.
- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation, 2001.
- ALMEIDA, A. de, ELIAN, S., NOBRE, J. Modificações e alternativas aos testes de Levene e de Brown e Forsythe para igualdade de variâncias e médias. *Revista Colombiana de Estadística*, v.31, n.2, p. 241-260, 2008.
- ARAUJO, R.C. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores de fermentação ruminal in vitro. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2010. Versões impressas e eletrônica.
- BARBOSA, L.C.A., DEMUNER, A.J., CLEMENTE, A.D., PAULA, V.F., ISMAILI, F.M.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius Raddi*. *Química Nova*, v. 30, n.8, p. 1959-1965, 2007.
- BIALOSKORSKI NETO, S. Agronegócio cooperativo. In: BATALHA, M. O. (Coord.). Gestão agroindustrial. São Paulo: Atlas, 2009.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2015.
- BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, n. 141, 2017.
- BROWN, M.B., FORSYTHE, A B. Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association*, v.69, p. 364–367, 1974a.
- BROWN, M.B., FORSYTHE, A.B. The Small Sample Behavior of Some Statistics which Test the Equality of Several Means. *Technometrics*, v.16, p. 129-132, 1974b.
- BUSSAB, W., MORETTIN, P.A. *Estatística Básica*, 5ª. Edição, São Paulo: Editora Saraiva, 2003.
- CHANG, H.J., KIM, H.J., CHUN, H.S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sciences*, v. 80, p. 835-841, 2007.
- CHOWDHURY, A.R.; TRIPANI, S. 2001. Essential oil from leaves of *Schinus terebinthifolius Raddi*. *Ind. Perfumer*, 45, 257-259.

CLEMENTE, A.D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2006, 63 f. Tese (Tese de doutorado), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2006. Versões impressas e eletrônica.

COLE, E.R., DOS SANTOS, R.B., LACERDA JÚNIOR, V., MARTINS, J.D.L., GRECO, S.J., CUNHA NETO, A. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.45, n.3, p. 821-828, 2014.

COUTINHO, I.H.I.L.S.; TORRES, O.J.M.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U.; SAHLKE, JUNIOR, H.J.; AGULHAM, M.A.; BACHLE, Ê.; CAMARGO, P.A.M.; PIMENTEL, S.K.; FREITAS, A.C.T. Efeito do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*) na cicatrização de anas, tomosescolônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, n.3, 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, v. 12, p. 564-582, 1999.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, N.R.M. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29, n.3, p. 617-622, 2005.

DOS SANTOS, A.C.A., ROSSATO, M., AGOSTINI, F., DOS SANTOS, P.L.; SEREFINI, L.A.; MOYNA, P., DELLACASSA, E., Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.

GEHRKE, I.T.S. Estudo Químico e Biológico das espécies *Schinus tentiscifolius*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) do RS. 2012, 184 f. Tese (Tese de doutorado), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2012, Versões impressas e eletrônica.

GOMES, L.J., SILVA-MANN, R., DE MATTOS, P.P., RABBANI, A.R.C. Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). São Cristóvão: Editora UFS, 2013.

ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Switzerland, November 2005. Disponível em: [https://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).pdf). Acesso: 28 de setembro de 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE/ SIDRA, Pesquisa Industrial Anual - Sistema IBGE de Recuperação de Dados Automática. 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pimpfbr/brasil>. Acesso: 2 de outubro de 2020.

KHOSHNAZAR, M., PARVARDEH, S., BIGDELI, M.R. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, v.29, n.8, p. 1049772020, 2020.

KIM, D.S., LEE, H.J., JEON, Y.-D., HAN, Y.H., KEE, J.Y., KIM, H.J., SHIN, H.J., KANG, J.W., LEE, B.S., KIM, S.H., KIM, S.J., PARK, S.H., CHOI, B.M., PARK, S.J., UM, J.Y. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF- κ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine*, v.43, n.04, p. 731–742, 2015.

LEITE, F. Validação em Análise Química, 4a ed., Campinas: Editora Átomo, 2002.

LEVENE, H. *In Contributions to Probability and Statistics*, OLKIN, I., GHURYE, S.G., HOEFFDING, W., MADOW, W.G., MANN, H.B. eds.; Stanford University Press: Stanford, 1960.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA-JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATSUO, A.L., FIGUEIREDO, C.R., ARRUDA, D.C., PEREIRA, F.V., SCUTTI, J.A.B., MASSAOKA, M.H., TRAVASSOS, L.R., SARTORELLI, P., LAGO, J.H.G. Alpha-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers anti-metastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 411, n.2, p. 449–454, 2011.

PAWLOWSKI, U., KALTCHUK-SANTOS, E., ZINI, E.B., SOARES, G.L.G. Óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* e *S. molle* (Anacardiaceae): indutores mitodepressivos e aneugênicos em meristemas de raiz de cebola e alface. *South African Journal of Botany*, v.80, p. 96-103, 2012.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROYSTON, J. B. Some techniques for assessing multivariate based on the Shapiro-Wilk W. *Applied Statistics*, v.32, n.2, p. 121-133, 1983.

SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, v.34, n.1, p. 3-21, 2001.

SARTORELLI, P.S., JEFFERSON, S., GUADAGNIN, R.C., LAGO, J.H.G., PINTO, É.G., TEMPONE, A.G., STEFANI, H.A., SOARES, M.G., SILVA, ADALBERTO, M. DA. Avaliação in vitro de tripanocida de derivados de pinano de óleos essenciais de frutas maduras de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae). *Química Nova*, v.35, n.4, p. 743-747, 2012.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS- SEBRAE. Como montar uma fábrica de óleos essenciais. Brasil. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ideias/como-montar-uma-fabrica-de-oleos-naturais-e-essencias,c2387a51b9105410VgnVCM1000003b74010aRCRD> . Acesso em: 28 de setembro de 2020.

SILVA, A.B., SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S.S.; LIMA, E.R.; MOTA, R.A.; CÂMARA, C.A.G.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi.). *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.1, p.158-163, 2010.

SILVA, M., PESSOTTI, B.M. de S., ZANINI, S.F., COLNAGO, G.L., NUNES, L.C., RODRIGUES, M.R.A., FERREIRA, L. Uso de óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.40, n.10, p. 2151-2156, 2010.

SILVA, M.A., PESSOTI, B.M. de S.; ZANINI, S.F.; COLNAGO, G.L.; NUNES, L.C., RODRIGUES, M.R.A., FERREIRA, L. Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.41, n.4, p. 676-681, 2011.

SINGH, A.K., SINGH, J., GUPTA, K.C., BROPHY, J.J. Essential oil of leaves and inflorescence of *Schinus terebinthifolius*: an exotic plant of India. *Journal of Essential Oil Research*, v.10, n.6, p. 697-699, 1998.

SOUZA, S.V.C., JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v.552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S.V.C., LIMA, J.A., TEODORO, J.C., JUNQUEIRA, R.G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Food Science and Technology*, v.27, n.4, p. 823-836, 2007.

THOMPSON, M., ELLISON, S.L.R., WOOD, R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, v.74, p. 835-855, 2002.

VIEGAS, M.C., BASSOLI, D.G. Utilização do Índice de Retenção Linear para Caracterização de Compostos Voláteis em Café Solúvel utilizando GC-MS e Coluna HP-INNOWAX. *Química Nova*, v.30, n.8, p. 2031-2034, 2007.