



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FERNANDO SÁBATO FONSECA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE
ETANOL EM ÁLCOOL GEL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO**

Recife

2021

FERNANDO SÁBATO FONSECA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE
ETANOL EM ÁLCOOL GEL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Pimentel Avelar

Coorientadora: Dr.^a Livia Rodrigues e Brito

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Nataly Soares Leite Moro, CRB4-1722

F676d Fonseca Júnior, Fernando Sábato
Desenvolvimento de métodos para determinação do teor de etanol em álcool gel utilizando espectroscopia no infravermelho médio e próximo / Fernando Sábato Fonseca Júnior. – 2021.
85 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Fernanda Pimentel Avelar.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2021.
Inclui referências e apêndice.

1. Química analítica. 2. Álcool gel. 3. COVID-19. 4. Espectroscopia no infravermelho. 5. Calibração multivariada. I. Avelar, Maria Fernanda Pimentel (orientadora). II. Título.

543 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2022 - 177

FERNANDO SÁBATO FONSECA JÚNIOR

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE
ETANOL EM ÁLCOOL GEL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 28/10/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Maria Fernanda Pimentel Avelar (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Claudete Fernandes Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ricardo Saldanha Honorato
Delegacia da Polícia Federal

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Prof^a Dr.^a Maria Fernanda Pimentel por toda dedicação e apoio.

À minha coorientadora e amiga Dr.^a Livia Brito por toda a ajuda e paciência, qualquer agradecimento é pouco para reconhecer o seu papel fundamental na produção deste trabalho.

Aos meus pais, Fernando e Perpétua, e minha irmã, Mariana, por todo apoio e compreensão.

Aos meus colegas de mestrado Aline, Bruno e Erklaylle pela amizade, ajuda e paciência, principalmente nos dias em que eu ia à universidade depois de trabalhar de plantão por 24 horas.

Aos meus colegas de trabalho pela compreensão e por terem me ajudado sempre que precisei.

À Prof. Dr.^a Leila Leal e aos integrantes da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade da UFPE por terem aberto as portas e permitido a produção de amostras de álcool gel para esse trabalho e ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco pelas amostras de álcool gel com HPMC.

Aos projetos NUQAAPE (FACEPE), NEQUIFOR (CAPES) e INCTAA (CNPq/FAPESP), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Com a pandemia de COVID-19, agências de saúde passaram a recomendar a constante higienização das mãos, visando controlar a disseminação do novo coronavírus, o que causou aumento na demanda por álcool gel. Esse aumento, aliado ao desabastecimento de insumos como carbômeros, resultou na escassez de álcool gel no mercado. Para contornar esse cenário, a Anvisa publicou resoluções permitindo a produção sem registro desse e de outros produtos relevantes no enfrentamento à situação de emergência de saúde pública. Embora necessário, o relaxamento das normas de regulação criou um cenário favorável ao surgimento de fábricas irregulares e de produtos com teor de etanol abaixo do recomendado para a eliminação do vírus. Para combater essa situação, foi necessário desenvolver métodos para garantir a qualidade dos produtos fabricados. Neste trabalho, foram propostos dois métodos utilizando a espectroscopia nas regiões do infravermelho próximo e médio, associadas à quimiometria. Foram construídos modelos de regressão PLS utilizando apenas amostras de soluções aquosas de etanol como também modelos com a adição de 2 e 4 amostras de álcool gel no conjunto de calibração. Os melhores resultados foram obtidos com os modelos utilizando 2 amostras de álcool gel no conjunto de calibração, cujos valores de RMSEP foram de 0,76 e 1,18% (m/m) nas regiões do MIR e NIR, respectivamente. Modelos de calibração univariada também foram construídos e apresentaram erros um pouco mais elevados. Utilizando os melhores modelos multivariados, um total de 100 amostras de álcool gel comerciais e apreendidas pela Polícia Civil de Pernambuco foram analisadas e observou-se que 32% apresentaram teor inferior ao mínimo permitido pela Anvisa. Por fim foi avaliada a estabilidade de 3 amostras de álcool em gel em recipientes fechados pelo período de até 105 dias, tendo-se observado que não houve alteração significativa nos teores de etanol no decorrer desse período.

Palavras-chave: álcool gel; COVID-19; espectroscopia no infravermelho; calibração multivariada.

ABSTRACT

After the COVID-19 pandemic, health agencies started to recommend constant hand sanitization to control the novel coronavirus from spreading further, which caused an increase in the demand for alcohol-based hand sanitizers. Such increase, along with raw material shortage such as carbomers, resulted in the scarcity of hand sanitizers in the market. In order to counteract this situation, Anvisa published resolutions allowing companies to manufacture these and other relevant products without the need of previous registration. Although necessary, this relaxation of regulatory policies created a favorable scenario to the emergence of irregular factories and products with ethanol concentration lower than the minimum recommended for the destruction of the virus. Thus, methods had to be developed to ensure the quality of manufactured products. In this work, two methods using near and mid infrared spectroscopy associated with chemometrics were proposed. PLS regression models were built using only aqueous solutions of ethanol as well as models with the addition of 2 and 4 gel hand sanitizers to the calibration dataset. The best results were obtained with the models using 2 gel hand sanitizer samples in the calibration dataset, whose values of RMSEP were 0,76 and 1,18% (m/m) in the MIR and NIR regions, respectively. Univariate calibration models were also built and presented slightly higher error values. Using the best multivariate models, a total of 100 commercial and seized samples of alcohol-based hand sanitizers were analyzed and 32% were determined to have less than the minimum concentration of ethanol required by Anvisa. Lastly, the stability of 3 samples of hand sanitizers in closed containers was evaluated for up to 105 days, after which no significative variation in the ethanol content was noticed.

Keywords: alcohol-based hand sanitizers; COVID-19; infrared spectroscopy; multivariate calibration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Preparo de amostras de álcool gel na FECDA/UFPE.	43
Figura 2 –	Aparato experimental para aquisição de espectros NIR no modo de transmitância com cubeta com caminho ótico de 2mm.	44
Figura 3 –	Características físico-químicas e composição do gel comercial utilizado nas análises de estabilidade com o método desenvolvido com dados espectrais na região do MIR.	47
Figura 4 –	Espectros brutos na região NIR de amostra de solução aquosa de etanol 70% utilizando cubetas de 2 e 5 mm.	48
Figura 5 –	Espectros brutos na região MIR das amostras preparadas em laboratório: (a) completo e (b) após remoção de região ruidosa.	49
Figura 6 –	Espectros brutos na região NIR das amostras preparadas em laboratório.	49
Figura 7 –	Curva de valores preditos versus referência do conjunto de predição usando os modelos PLS tipo 2 nas regiões (a) MIR e (b) NIR.	53
Figura 8 –	Gráficos de (a) dados pré-processados usando o MSC e (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do MIR.	54
Figura 9 –	Gráficos de (a) dados pré-processados usando o MSC (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do NIR.	54
Figura 10 –	Gráficos de (a) dados pré-processados usando a 2ª derivada e (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do NIR.	55
Figura 11 –	Modelos univariados construídos na região do MIR: (a) curva analítica e (b) curva de valores preditos versus referência.	56
Figura 12 –	Modelos univariados construídos na região do NIR em 1378,87 nm: (a) curva analítica e (b) curva de valores preditos versus referência; e em 1422,23 nm: (c) curva analítica e (d) curva de valores preditos versus referência.	57
Figura 13 –	Resultado de amostras reais usando os modelos construídos nas regiões do MIR e NIR.	58
Figura 14 –	Distribuição de frequência da diferença de teor calculado entre os métodos multivariados na região MIR e NIR.	60
Figura 15 –	Análise de estabilidade no MIR de uma amostra comercial de 70% (m/m).	61
Figura 16 –	Análise de estabilidade de duas amostras no NIR: (a) 70% (m/m) produzida com HPMC e (b) 75% (m/m) produzida com carbopol.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula do álcool gel do Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira.	17
Tabela 2 – Distribuição de teores de etanol declarados nos rótulos das amostras reais.	46
Tabela 3 – Modelos de regressão PLS com 7 amostras no conjunto de predição, com destaque nos selecionados como melhores de cada tipo.	51
Tabela 4 – Melhores modelos de regressão PLS dos tipos 1 e 2 com 09 amostras na predição.	52
Tabela 5 – Modelos univariados.	55
Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação dos modelos PLS.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Refletância total atenuada, do inglês <i>attenuated total reflectance</i>
COVID-19	Doença do coronavírus 2019, do inglês <i>coronavirus disease 2019</i>
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FECDA/UFPE	Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade da Universidade Federal de Pernambuco
FIR	Infravermelho distante, do inglês <i>far infrared</i>
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama, do inglês <i>gas chromatography with flame-ionization detector</i>
GL	Gay-Lussac
HEC	Hidroxietilcelulose
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HS-SPME	Técnica de microextração em fase sólida com <i>headspace</i> , do inglês <i>headspace solid-phase microextraction</i>
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LVF	Filtro linear variável, do inglês <i>linear variable filter</i>
MIR	Infravermelho médio, do inglês <i>mid-infrared</i>
MSC	Correção do espalhamento multiplicativo, do inglês <i>multiplicative scatter correction</i>
NAS	Sinal analítico líquido, do inglês <i>net analyte signal</i>
NIR	Infravermelho próximo, do inglês <i>near infrared</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Componente principal, do inglês <i>principal component</i>
PCA	Análise por componentes principais, do inglês <i>principal component analysis</i>
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais, do inglês <i>partial least squares - discriminant analysis</i>
PLS	Método dos mínimos quadrados parciais, do inglês <i>partial least squares</i>
QSAR	Do inglês, <i>quantitative structure-activity relationship</i>
RMSE	Raiz do erro médio quadrático, do inglês <i>root mean square error</i>
RMSEC	Raiz do erro médio quadrático de calibração, do inglês <i>root mean square error of calibration</i>

RMSECV	Raiz do erro médio quadrático de validação cruzada, do inglês <i>root mean square error of cross-validation</i>
RMSEP	Raiz do erro quadrático médio de predição, do inglês <i>root mean square error of prediction</i>
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2, do inglês <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SARS	Síndrome respiratória aguda grave, do inglês <i>severe acute respiratory syndrome</i>
MERS	Síndrome respiratória do Oriente Médio, do inglês <i>middle east respiratory syndrome</i>
SNV	Variação normal padrão, do inglês <i>standard normal variate</i>
SPA-LDA	Análise discriminante linear com seleção de variáveis pelo algoritmo das projeções sucessivas, do inglês <i>successive projections algorithm – linear discriminant analysis</i>
VIP	Do inglês <i>variable importance in projection</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	ÁLCOOL EM GEL	16
3.1.1	Eficiência do álcool	17
3.1.2	Eficiência contra o Sars-CoV-2	18
3.1.3	Contaminação com metanol	19
3.1.4	A importância do uso do álcool no combate à COVID-19	20
3.2	ANVISA	21
3.2.1	Resoluções publicadas antes de março de 2020	21
3.2.2	Resoluções publicadas após de março de 2020	23
3.3	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ETANOL	25
3.4	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	31
3.4.1	Região do Infravermelho Médio	32
3.4.1.1	Refletância Total Atenuada	33
3.4.2	Região do Infravermelho Próximo	34
3.5	QUIMIOMETRIA	35
3.5.1	Pré-processamentos	35
3.5.1.1	Derivadas	36
3.5.1.2	Correção do espalhamento multiplicativo	37
3.5.1.3	Variação normal padrão	37
3.5.2	Calibração multivariada	38
3.5.2.1	Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)	38
3.5.2.2	Validação e figuras de mérito	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	PREPARO DAS AMOSTRAS	42
4.2	AQUISIÇÃO DOS DADOS	42
4.3	TRATAMENTO DOS DADOS	44
4.4	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	45
4.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	SELEÇÃO DO CAMINHO ÓTICO PARA O NIR	48
5.2	ESPECTROS E ATRIBUIÇÃO DE BANDAS	48
5.3	MODELOS DE REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS	50
5.4	CONSTRUÇÃO DE MODELOS UNIVARIADOS	53

5.5	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS	57
5.6	ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS	58
5.7	DIFERENÇAS ENTRE AS PREDIÇÕES DOS MÉTODOS DE NIR E MIR	59
5.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE	60
6	CONCLUSÃO	63
6.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA CIENTIFICA	70
	APÊNDICE B – RESULTADOS DOS MODELOS COM 9 AMOSTRAS NO CONJUNTO DE PREDIÇÃO, COM DESTAQUE NOS MODELOS SELECIONADOS DE CADA TIPO	71
	APÊNDICE C – TEORES DE ETANOL PREDITOS DAS AMOSTRAS REAIS UTILIZANDO OS MELHORES MODELOS DO TIPO 2	72
	APÊNDICE D – RESULTADOS DA ANÁLISE DE ESTABILIDADE COM O MÉTODO NA REGIÃO DO MIR	81
	APÊNDICE E – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ESTABILIDADE COM O MÉTODO NA REGIÃO DO NIR	84

1 INTRODUÇÃO

A pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19, do inglês *coronavirus disease 2019*), causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV2, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), reforçou a necessidade do uso de sanitizantes para as mãos, uma vez que agências de saúde pública nacionais e a Organização Mundial da Saúde (OMS) passaram a recomendar a higienização frequente das mãos como uma das precauções básicas para evitar a disseminação do vírus. Diante desse cenário, houve aumento repentino na demanda de álcool em gel e isso provocou interrupções nas cadeias produtivas devido à falta de insumos.

No Brasil, para combater a escassez de insumos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) autorizou, de forma temporária e emergencial, empresas regularizadas que atuam na produção de medicamentos, saneantes e cosméticos a fabricar e comercializar preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem requerer autorização prévia. Além disso, foi autorizado o uso de insumos diferentes daqueles indicados pelo Formulário Nacional de Farmacopeia Brasileira, desde que estes tenham a mesma função farmacotécnica e que seja garantida a eficácia e estabilidade do produto.

Essa autorização, aliada a um cenário de alta demanda por álcool em gel e baixa oferta por parte dos produtores, foi favorável ao aparecimento de produtos irregulares, apresentando teores de etanol abaixo do recomendado, cujo uso causaria uma falsa sensação de segurança ao consumidor. Além disso, surgiram fábricas clandestinas que não se enquadravam nos parâmetros da autorização da Anvisa e não possuíam processos de produção adequados para garantir a qualidade do produto. Dessa forma, ficou explícita a necessidade de monitoramento por parte das autoridades responsáveis para garantir que a população tivesse acesso a álcool gel e sanitizantes eficientes e seguros.

Apesar da determinação do teor de etanol poder ser feita utilizando uma série de métodos, como a cromatografia gasosa, espectrofotometria e alcoometria, baseada na densidade da amostra, esses métodos podem ser afetados pelos demais componentes presentes no álcool gel, requerendo preparos de amostra complexos e demorados. O uso da espectroscopia no infravermelho associado à quimiometria é uma alternativa para determinar o teor de etanol e já possui precedentes na literatura

em amostras diversas, como combustíveis e bebidas (MENDES *et al.*, 2003; RAMASAMI *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2008; SALES *et al.*, 2019).

Neste trabalho, foram propostos dois métodos para a determinação do teor de etanol em amostras de álcool gel usando técnicas de espectroscopia no infravermelho, que são simples, rápidas e não-destrutivas. O primeiro método utilizou um espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier com acessório de refletância total atenuada, que é um tipo de equipamento comumente encontrado nos laboratórios de perícia forense do Brasil. Já o segundo método utilizou um espectrômetro portátil operando na região do infravermelho próximo, que é um equipamento de baixo custo e permite ao usuário efetuar análises *on-site*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver dois métodos para determinar o teor de etanol em amostras de álcool gel usando espectroscopia no infravermelho médio e próximo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir amostras padrão de álcool gel com teores de etanol conhecidos;
- Construir modelos de regressão PLS e univariados para determinar o teor de etanol em amostras de álcool gel;
- Verificar se amostras comerciais adquiridas na região metropolitana de Recife e apreendidas pela Polícia Civil de Pernambuco contém teor de etanol condizente com o valor descrito no rótulo;
- Comparar os dois métodos desenvolvidos, do infravermelho médio e próximo, quanto à sua capacidade de quantificar o teor de etanol adequadamente;
- Avaliar amostras de álcool gel produzidas com diferentes insumos quanto à estabilidade do teor de etanol ao mantê-las fechadas por mais de 90 dias.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ÁLCOOL EM GEL

Álcool gel é uma preparação contendo álcool apresentada na forma de gel que tem como finalidade ser usado na antissepsia da pele e na desinfecção de superfícies e materiais. Pode conter um ou mais tipos de álcoois e outros ingredientes ativos, excipientes e umectantes. A concentração de álcool presente no gel pode ser expressa de duas formas: °INPM ou °GL. A primeira é a sigla relativa a Instituto Nacional de Pesos e Medidas e indica a porcentagem de álcool em termos da fração mássica, podendo também ser expressa como % (m/m). Enquanto a segunda, °GL, é a abreviação de Gay-Lussac, expressando o teor em relação ao percentual de volume, % (v/v).

Gel tem a seguinte definição, segundo o Formulário Nacional de Farmacopeia Brasileira:

É a forma farmacêutica semissólida de um ou mais princípios ativos que contém um agente gelificante para fornecer viscosidade a um sistema no qual partículas de dimensão coloidal - tipicamente entre 1 nm e 1 µm - são distribuídas uniformemente. Um gel pode conter partículas suspensas. (ANVISA, 2012, p. 18).

A OMS dispõe de um guia de produção local contendo duas formulações de gel antisséptico recomendadas para quando não houver disponibilidade de produtos comerciais (WHO, 2010). As formulações do guia são, na verdade, soluções aquosas de álcool (etílico ou isopropílico) sem a adição de agentes gelificantes, sendo, portanto, líquidos de baixa viscosidade. Essas soluções, embora eficazes, são difíceis de portar e utilizar, pois podem ser facilmente derramadas, o que pode diminuir a eficiência antisséptica por diminuir a quantidade de álcool em contato com a superfície a ser limpa. Além disso, existe o risco de incêndio e ingestão acidental por crianças. Para os consumidores, formulações de álcool na forma de gel são mais convenientes e seguras para transportar e utilizar em situações do cotidiano. Esse tipo de preparação também reduz a taxa de evaporação do álcool e facilita o processo de higienizar as mãos por ser mais fácil de espalhar.

Quanto à composição do álcool em gel, o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira estabelece a formulação padrão, que está apresentada na Tabela 1, e

orientações para o preparo conforme descrito a seguir: “Misturar o álcool etílico e a água. Dispersar o carbômer 980 sob agitação. Completar o volume com água purificada e ajustar o pH entre 5,0 e 7,0 com solução de trietanolamina 50% (p/v), para obter a consistência adequada.”

Tabela 1 – Fórmula do álcool gel do Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira.

Componentes	Quantidade
Álcool etílico 96 °GL	75,73g
Carbômer 980	0,5g
Solução de trietanolamina a 50% (p/v)	qs
Água purificada qsp	100g

Fonte: Anvisa (2012, p. 60).

Quanto à embalagem e ao armazenamento, é recomendado que se utilize um recipiente adequado, de plástico, fechado e protegido da luz, mantido sob temperatura inferior a 25 °C.

Esta formulação não inclui outros excipientes como emolientes, preservantes, colorantes ou fragrâncias, que podem ser encontrados em produtos comerciais à venda no Brasil.

Um dos excipientes mais comuns são os emolientes, que são adicionados para manter a maciez e umidade da pele e, conseqüentemente, para amenizar o efeito de ressecamento que o etanol presente no álcool gel pode causar quando usado com frequência. Sua adição melhora a aceitabilidade e tolerância por parte dos usuários, tornando a frequente higienização das mãos ligeiramente mais agradável. Uma das substâncias mais utilizadas é o glicerol, devido ao seu baixo custo e ao fato de ser um umectante seguro e miscível em água e álcool.

3.1.1 Eficiência do álcool

A eficiência do álcool em gel depende dos seguintes fatores: o tipo de álcool utilizado, a concentração, a quantidade aplicada nas mãos e o tempo de exposição (TODD *et al*, 2010). Os álcoois mais comumente utilizados são o etanol, isopropanol e n-propanol, sendo o etanol o álcool padrão no Brasil. Em relação aos demais álcoois,

o etanol tem atividade viricida inferior quando usado na mesma concentração, mas tem como vantagem ser mais bem tolerado pela pele (SUCHOMEL; ROTTER, 2011).

Quanto à concentração, a Anvisa estabeleceu que o álcool gel deve conter teor de etanol igual a 70% (m/m), enquanto a OMS definiu que concentrações entre 60% e 95% (v/v) são consideradas seguras e eficientes para a desinfecção em geral, inclusive para o uso contra o SARS-CoV-2. Entretanto, diversos pesquisadores (SUCHOMEL *et al.*, 2012; EGGERSTEDT, 2013; WILKINSON *et al.*, 2017) determinaram que concentrações mais elevadas, na faixa de 80 a 85% (v/v), podem reduzir o tempo de contato necessário para que o álcool desempenhe seu papel bactericida. Apesar dessas evidências, a OMS mantém a recomendação de teor máximo de 95% (v/v).

Os demais fatores, quantidade aplicada e tempo de exposição, estão intimamente ligados. Não há uma recomendação definitiva por parte das agências de saúde pública acerca da quantidade exata de álcool gel a ser aplicada, uma vez que a área da superfície a ser higienizada, diretamente relacionada ao tamanho das mãos, varia de pessoa para pessoa. A Anvisa, em seus manuais, se limita a recomendar que o usuário siga as recomendações do fabricante do produto. Quanto ao tempo de exposição, a recomendação geral varia entre 10 e 60 segundos, não sendo possível determinar um número exato devido às variáveis tamanho das mãos, dose de álcool gel e sua formulação. Segundo a Anvisa, o procedimento de fricção antisséptica das mãos utilizando preparação alcoólica deve durar entre 20 e 30 segundos (ANVISA, 2009).

3.1.2 Eficiência contra o Sars-CoV-2

Segundo Jansen (2020), não era possível fazer afirmações definitivas acerca da eficiência de desinfetantes contra o SARS-CoV-2 porque se trata de um novo vírus e os sanitizantes para as mãos nunca haviam sido testados para ele. Todavia, Siddharta *et al.* (2017) avaliaram a eficiência de duas formulações alcoólicas recomendadas pela OMS, uma de etanol a 80% (v/v) e outra de álcool isopropílico a 75% (v/v), para destruir os vírus da Zika, Ebola, os coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *severe acute respiratory syndrome*) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *middle east respiratory syndrome*), além de outros vírus envelopados, tendo obtido resultado positivo quanto

à destruição dos vírus, o que confirmou que preparações alcoólicas podem ser utilizadas como medida eficaz de prevenção de infecções durante surtos virais.

Com o objetivo de avaliar se o vírus SARS-CoV-2 pode ser transmitido por meio de contato com superfícies contaminadas, foi estudada a sua sobrevivência em diversas superfícies. Foi determinado que ele pode sobreviver por períodos prolongados em vários materiais, como plástico e aço por 2 a 3 dias (VAN DOREMALEN et al., 2020). Posteriormente, concluiu-se que o principal meio de contágio é por aerossóis no ar e que o risco de se contaminar após contato com a superfície de objetos contaminados é baixo. Apesar disso, a disponibilização de álcool gel em locais públicos é uma forma eficiente de mitigar a disseminação da COVID-19 (PITOL; JULIAN, 2021).

3.1.3 Contaminação com metanol

A qualidade do etanol comercializado no Brasil é regulamentada de acordo com o seu uso: como insumo farmacêutico ou como combustível. De acordo com as monografias da Farmacopeia Brasileira, o teor máximo de metanol permitido no etanol destinado a uso farmacêutico é de 0,02%. Para uso como combustível, a Resolução ANP nº 740, de 15 de agosto de 2018, estabeleceu o teor de 0,5% em volume como limite máximo de metanol em etanol anidro combustível e etanol hidratado combustível. Esse teor é, portanto, 25 vezes maior que o permitido para uso pela Farmacopeia, sendo necessário cuidado, por parte dos fabricantes de álcool em gel, ao adquirir etanol com os parâmetros adequados de qualidade. Outros parâmetros de qualidade apresentam diferenças consideráveis, como o limite de resíduos não voláteis que é duas vezes maior para combustíveis. Já o teor de hidrocarbonetos é de até 3 ppm para combustíveis e, para insumos farmacêuticos, é medido com base no teor de benzeno que deve ser de até 2 ppm.

A U.S. Food and Drug Administration (FDA) publicou uma lista de mais de 250 sanitizantes para as mãos que não devem ser utilizados pois foram reprovados por apresentar teor de etanol abaixo do mínimo recomendado, contaminação microbiana ou por conter metanol ou 1-propanol (FDA, 2021). Embora estudos indiquem que há uma série de produtos com teor de etanol abaixo do exigido em norma, não houve no Brasil iniciativa similar à da FDA de publicação de listas de produtos não recomendados por parte da Anvisa.

3.1.4 A importância do uso do álcool no combate à COVID-19

No âmbito dos serviços de saúde, as mãos são a principal via de transmissão de microrganismos durante a assistência aos pacientes, uma vez que a pele, por meio do contato com objetos e superfícies contaminados pode se tornar um reservatório de diversos microrganismos (ANVISA, 2009). Neste contexto, a higienização das mãos é a medida individual mais simples e barata utilizada no controle de infecções relacionadas à assistência à saúde.

A Anvisa é o órgão responsável, no âmbito federal, pela coordenação de ações para o controle de infecções em serviços de saúde, incentivando medidas voltadas à prevenção de riscos e à promoção da segurança do paciente. Foram publicados, inclusive, diversos manuais e guias técnicos, como o “Higienização das mãos em serviços de saúde”, contendo informações sobre o tema não só para profissionais, como também para familiares dos pacientes e visitantes dos serviços de saúde (ANVISA, 2009).

O termo “higienização das mãos” é mais abrangente que “lavagem das mãos” e tem como finalidade a remoção de sujidades, suor, oleosidade, pelos, células descamativas e da microbiota da pele, interrompendo a transmissão de infecções veiculadas ao contato, além de prevenir e reduzir infecções causadas pelas transmissões cruzadas. Dessa forma, o termo é mais amplo pois inclui as seguintes formas de higienização:

1. Higienização simples das mãos, por exemplo utilizando água e sabão;
2. Higienização anti-séptica das mãos, substituindo o sabão por um anti-séptico como um anti-séptico degermante;
3. Fricção anti-séptica das mãos, utilizando preparações alcoólicas;
4. Anti-sepsia cirúrgica ou preparo pré-operatório das mãos.

Embora a higienização das mãos seja uma prática relacionada aos serviços de saúde dada a grande preocupação relacionada ao controle da disseminação de microrganismos multirresistentes, esses cuidados foram expandidos para a população em geral devido à pandemia de COVID-19.

3.2 ANVISA

Devido à sua posição de órgão responsável por promover a saúde da população por meio de controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária e por possuir competência para estabelecer normas, propor, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de vigilância sanitária (BRASIL, 1999), a Anvisa produziu uma série de normas regulamentares na forma de Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) a fim de garantir a manutenção do padrão de qualidade dos produtos e serviços destinados à saúde da população, além de garantir Boas Práticas de produção e exposição à venda.

3.2.1 Resoluções publicadas antes de março de 2020

Em 20 de fevereiro de 2002, a RDC nº 46 foi publicada com o objetivo reduzir a quantidade de acidentes causados pelo uso de álcool de forma inadequada, desde queimaduras até a ingestão acidental, comum em acidentes domésticos envolvendo crianças. Para isso, foi prevista a inclusão de advertências no rótulo e o uso de desnaturantes, substâncias de sabor ou odor repugnante que não apresentam efeito toxicológico capaz de causar danos à saúde humana, que são adicionadas com o objetivo de impedir o uso do álcool na produção de bebidas, alimentos ou produtos farmacêuticos.

A resolução regulamenta a industrialização, exposição à venda ou entrega ao consumo do álcool etílico, de acordo com as concentrações, condições e finalidades, estabelecendo:

1. Álcool etílico acima de 54% (v/v): comercializado somente na forma de gel desnaturado e no volume máximo de 500g.
2. Álcool etílico abaixo de 54% (v/v): deve ser adicionado desnaturante para impedir uso indevido.
3. Álcool etílico hidratado ou anidro para fins industriais ou testes laboratoriais e pesquisa em volume menor ou igual a 200 L: deve conter tampa com lacre de inviolabilidade e conter a seguinte advertência no rótulo: "PERIGO: PRODUTO EXCLUSIVAMENTE DE USO INSTITUCIONAL - PROIBIDA A VENDA DIRETA AO PÚBLICO".

Quando a finalidade de uso do álcool não se enquadrar nas condições técnicas de uso de desnaturante ou na forma de gel, farmácias e demais locais de dispensação poderão comercializar álcool puro ou diluído até o volume máximo de 50mL. Os casos com finalidade exclusivamente industrial com volumes acima de 200 L ficaram dispensados das exigências dessa resolução.

Essa resolução estabelece, ainda, a viscosidade mínima para os álcoois em gel, sendo de 4000 cP para concentrações abaixo de 68% (m/m) e de 8000 cP acima desse teor, determinada usando viscosímetro Brookfield RVT com Spindle número 4 a 20 rpm e 25 °C.

Em 25 de outubro de 2010, foi publicada a RDC nº 42, que estabeleceu a obrigatoriedade da disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos pelos serviços de saúde do país. O objetivo dessa resolução era de promover higienização das mãos nesses locais de acordo com as diretrizes da OMS e, com isso, prevenir e controlar infecções relacionadas à assistência à saúde, visando a segurança dos pacientes e profissionais de saúde.

Essa Resolução definiu uma série de termos relevantes, dentre os quais se destacam:

III - Fricção antisséptica das mãos com preparação alcoólica: aplicação de preparação alcoólica nas mãos para reduzir a carga de microrganismos sem a necessidade de enxague em água ou secagem com papel toalha ou outros equipamentos.

IV - Higienização das mãos: termo genérico aplicável à higienização simples das mãos, higienização antisséptica das mãos, fricção antisséptica das mãos com preparação alcoólica e antisepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório de mãos.

IX - Preparação alcoólica para higienização das mãos sob a forma líquida: preparação contendo álcool, na concentração final entre 60% a 80% destinadas à aplicação nas mãos para reduzir o número de microrganismos. Recomenda-se que contenha emolientes em sua formulação para evitar o ressecamento da pele.

X - Preparação alcoólica para higienização das mãos sob as formas gel, espuma e outras: preparações contendo álcool, na concentração final mínima de 70% com atividade antibacteriana comprovada por testes de laboratório in vitro (teste de suspensão) ou in vivo, destinadas a reduzir o número de microrganismos. Recomenda-se que contenha emolientes em sua formulação para evitar o ressecamento da pele. (ANVISA, 2021).

Foram estabelecidos, ainda, os locais em que é obrigatória a disponibilização de preparação alcoólica antisséptica para higienização das mãos e permite que, além destes, profissionais de saúde portem frascos individuais de bolso. É explicitado, entretanto, que o uso de preparações alcoólicas não substitui a higienização simples das mãos nos casos em que há presença visível de sujidade nas mãos.

Os produtos devem ser adquiridos comercialmente atendendo às exigências da Anvisa ou manipulados em farmácias hospitalares e magistrais seguindo as Boas Práticas de manipulação. Além disso, foi definido que é proibido, para fins de higienização das mãos, o uso de álcool regularizado na Anvisa como produto saneante. Essa proibição se deu devido à diferença entre os insumos utilizados, que no caso de álcool gel antisséptico para as mãos, devem ser de grau farmacêutico. Quanto à composição, foi definido que esta deve seguir os compêndios oficiais, incluindo as formulações da OMS.

3.2.2 Resoluções publicadas após de março de 2020

A Anvisa publicou três Resoluções de Diretoria Colegiada no ano de 2020 para tratar de procedimentos extraordinários e temporários devido à emergência de saúde pública internacional causado pelo SARS-CoV-2 e que estavam relacionadas com a produção e uso de álcool gel.

A primeira foi a RDC nº 347, de 17 de março de 2020, que definiu os critérios e os procedimentos para a exposição à venda de preparações antissépticas ou sanitizantes officinais, permitindo que farmácias magistrais comercializem álcool etílico 70% (m/m), álcool gel, álcool etílico glicerinado 80% (v/v), álcool isopropílico glicerinado 75% (v/v), água oxigenada 10 volumes e digliconato de clorexidina 0,5% (m/v).

Em seguida foi publicada a RDC nº 350, de 19 de março de 2020, que definiu os critérios e os procedimentos para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes officinais sem prévia autorização da Anvisa. Assim, foi permitido que empresas de medicamentos, saneantes e cosméticos regularizadas produzissem álcool 70% (m/m) nas suas diversas formas de apresentação, quer seja gel ou líquido, bastando ter a Autorização de Funcionamento (AFE), alvará ou licença sanitária e demais outorgas públicas para funcionamento, inclusive para fabricação e armazenamento de substância inflamável. Embora tenha sido dispensada a

necessidade de registro do produto, a Anvisa definiu que as empresas deveriam seguir os critérios técnicos de qualidade estabelecidos nas demais Resoluções do órgão.

Ambas as resoluções publicadas em março de 2020 tiveram validade de 180 dias, validade igual à dos produtos que viessem a ser produzidos, e ficou estabelecido que a fabricação dos antissépticos e sanitizantes deveria seguir as diretrizes do Formulário Nacional de Farmacopeia Brasileira. Devido à escassez de matéria-prima, a Anvisa permitiu que, na ausência de veículos, excipientes ou substâncias adjuvantes, fosse feita a substituição por insumos que tenham a mesma função farmacotécnica e que garantam a mesma eficácia e estabilidade ao produto. Por fim, foram suspensas as restrições à venda de álcool etílico com teor acima 54% (v/v) na forma líquida.

Ao se aproximar do prazo de validade das Resoluções anteriores e devido à continuação da emergência em saúde pública provocada pelo SARS-CoV-2, a Anvisa publicou a RDC nº 422, de 16 de setembro de 2020. Essa resolução trouxe alterações à RDC nº 350 que facilitaram o seu entendimento e aplicação, preenchendo lacunas relevantes.

Essa nova resolução esclareceu as concentrações dos produtos que não estavam explícitas se eram em base volumétrica ou mássica e estabeleceu que empresas fabricantes de cosméticos e saneantes podem produzir somente álcool gel. Sendo assim, as demais preparações antissépticas oficiais listadas só podem ser produzidas, isentas de registro, por empresas de medicamentos.

Houve, ainda, uma alteração de grande valia para a atividade regulatória e para o controle de qualidade das empresas fabricantes de álcool em gel, que foi a determinação de que a concentração de álcool no produto cosmético não poderá ter valor que represente variação superior a 10% em relação ao teor declarado na rotulagem do produto em °INPM, ou % (m/m). Entretanto, quando os produtos forem destinados aos serviços de saúde, devem respeitar o teor de álcool mínimo de 68,25% (m/m), exceto quando na forma líquida.

Por fim, as preparações produzidas com base nessa resolução continuam tendo prazo de validade de 180 dias, porém permitiu-se que empresas que fizerem o registro durante o prazo de vigência da resolução possam aplicar o novo prazo de validade aprovado às unidades em estoque por meio de retrabalho. Quanto à vigência da Resolução, que encerraria em setembro de 2020, essa foi modificada para cessar

automaticamente uma vez reconhecido que não se configura mais a situação de emergência em saúde pública pelo Ministério da Saúde.

3.3 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ETANOL

A determinação do teor de etanol pode ser feita utilizando uma série de métodos, contudo, alguns desses métodos requerem equipamentos caros e um preparo de amostra demorado, o que pode ser uma dificuldade na rotina dos laboratórios forenses, além de poderem ser afetados pelos demais componentes presentes nas amostras de álcool gel.

Salik e Povh (1993) apresentaram um método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas de 0 a 20% (v/v) de etanol com base na variação de cor que ocorre na sua oxidação a ácido acético pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. Esse método foi proposto para substituir a determinação volumétrica do excesso de dicromato por meio de titulação utilizando sulfato ferroso amoniacal ou iodometria.

Pereira *et al.* (2018) efetuaram a análise de amostras de álcool etílico comerciais utilizando espectroscopia Raman. Para isso, construíram uma curva de calibração a partir de amostras de etanol e água destilada, nos teores de 40%, 50%, 60%, 70% e 80% (v/v), utilizando espectrômetro Raman com fibra ótica, laser com comprimento de onda de 830 nm, potência de 250 mW, tempo de exposição de 1 s e 10 acumulações. As amostras foram acondicionadas em cubeta de quartzo durante a análise para evitar evaporação e o pico mais intenso obtido, em 884 cm^{-1} , foi utilizado. Neste trabalho, de um total de 9 amostras analisadas, 3 eram de álcool líquido, 2 de álcool gel, 2 de acendedores em gel e 2 de acendedores sólidos. Para as amostras de álcool líquido, obteve-se erro inferior a 0,5% quando comparado ao teor descrito no rótulo. As amostras de álcool gel apresentaram teores de 69,1% e 72,9% (v/v), sendo o valor declarado no rótulo da primeira de 65° INPM, equivalente a 72,4% (v/v), e a segunda não apresentava o teor no rótulo. As amostras de acendedores em gel foram as que apresentaram maior diferença entre os valores declarados, 80,0% e 85,5% (v/v), e os valores estimados, 71,5% e 79,8% (v/v), respectivamente. Nas amostras de acendedores sólidos, não foi possível estimar a concentração devido à sua formulação, contendo componentes sólidos de estabilização que comprometeram a estimativa. Embora tenham observado que ingredientes das amostras podem

causar interferências, os autores não validaram o método com a utilização de amostras de álcool gel de teor conhecido, se limitando à comparação com o valor descrito no rótulo. Além disso, a quantidade de amostras analisadas foi muito pequena, sendo avaliadas apenas 2 de álcool gel.

O primeiro trabalho publicado envolvendo a espectroscopia na região do infravermelho para determinação do teor de álcool em álcool gel foi desenvolvido pelo nosso grupo e publicado em 2020 (FONSECA *et al.*, 2020). Logo em seguida, Pasquini *et al.* (2020) propuseram o uso de espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared spectroscopy*) baseada em um instrumento portátil de baixo custo para o monitoramento da qualidade de álcool gel. Foram estabelecidas duas abordagens de avaliação, a primeira delas qualitativa, com a finalidade de se identificar falhas grosseiras do produto por meio da projeção do resultado da análise por componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) da amostra questionada no espaço delimitado pelos componentes principais das amostras preparadas em laboratório com concentração e composição conhecidas. Já a segunda abordagem, quantitativa, é baseada na determinação do teor de etanol usando regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*).

Neste trabalho, foram preparadas amostras com três tipos de formulações diferentes, todas contendo água e etanol, sendo que (i) a primeira continha somente esses dois componentes, (ii) a segunda continha glicerol e peróxido de hidrogênio e (iii) a terceira continha carbômero (também conhecido como carbopol) e trietanolamina. Além das amostras preparadas em laboratório, foram adquiridas 41 amostras comerciais para serem analisadas com os modelos construídos. Nas avaliações qualitativas, os autores encontraram que as duas primeiras componentes principais (PCs, do inglês *Principal Components*) explicaram 99% da variância e que a informação dessas PCs é dominada pela razão entre o teor de álcool e água. Os autores estabeleceram elipses para delimitar faixas de teor de etanol dentro do espaço gerado pelas PCs baseados nos teores das amostras preparadas em laboratório. Ao projetar as amostras comerciais nesse espaço, 7 dessas estavam fora da área delimitada e foram assinaladas como amostras não-conformes.

Quanto à abordagem quantitativa, foram construídos três modelos PLS, cada um utilizando somente um tipo de amostra e um modelo misto utilizando amostras de soluções aquosas de álcool e amostras de álcool gel produzidas segundo a

formulação preconizada pela Farmacopeia Brasileira (formulação tipo iii). O modelo que tinha somente amostras aquosas de água e etanol obteve o menor valor de raiz do erro quadrático médio de predição (RMSEP, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*), 0,68% (m/m), já os modelos com amostras de formulações distintas de álcool gel apresentaram valores de RMSEP mais elevados, 0,94 e 1,0% (m/m) para as formulações (ii) e (iii), respectivamente. Todos esses modelos foram construídos utilizando duas variáveis latentes (VLs), já o modelo misto foi construído com três VLs e teve RMSEP de 0,96%, similar ao encontrado nos dois modelos construídos apenas com amostras de álcool gel, porém utilizando uma VL a mais. Esses resultados levaram os autores a concluir que a presença de carbômero, na concentração de 0,5% (m/m), preconizada pela Farmacopeia Brasileira, não implica efeito significativo na determinação do teor de etanol. O modelo misto foi utilizado para determinar a concentração de etanol das 41 amostras comerciais e foram encontrados valores entre 56 e 77% (m/m). As sete amostras identificadas pela abordagem qualitativa como não-conformes apresentaram teores entre 56 e 62% (m/m), abaixo do preconizado pela Anvisa, e confirmaram o resultado obtido pela projeção. Por fim, o artigo se destaca por avaliar a possibilidade de teores de glicerol, peróxido de hidrogênio e carbômero afetarem a determinação da concentração de etanol. Foram analisadas 18 amostras produzidas em laboratório variando os teores dessas três substâncias e os autores concluíram que o glicerol foi o reagente que mais causou interferência e que, no geral, a interferência causada pela adição de quantidades variáveis de aditivos nas formulações de álcool em gel analisadas é tolerável, com erro absoluto médio de 1,3% (m/m). Os autores ainda ressaltam que amostras comerciais costumam apresentar uma série de aditivos além dos que foram testados, mas que não devem afetar a determinação de etanol significativamente devido à baixa concentração utilizada desses. O trabalho teve um grande enfoque na utilização de métodos quimiométricos, mas não avaliou a possibilidade de se efetuar a determinação do teor por meio de modelos univariados mais simples, mesmo tendo identificado bandas relacionadas às moléculas de água e etanol.

Berardi *et. al* (2020) analisou o teor de etanol de sete amostras de géis antissépticos para as mãos usando cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography with flame-ionization detector*) e a técnica de microextração em fase sólida com *headspace* (HS-SPME, do inglês *headspace solid-phase microextraction*). A curva de calibração externa foi construída

utilizando amostras de álcool gel padrão, preparadas utilizando mistura hidroalcolica, carbopol 974 a 1% m/m e trietanolamina em quantidade suficiente para ajustar o pH até 7. Foram analisadas as amostras de álcool gel comerciais, das quais 3 apresentaram teor inferior a 60% (m/m), teor mínimo recomendado pela OMS. Os autores realizaram, também, teste de atividade antimicrobiana de acordo com os padrões europeus, utilizando duas cepas de bactérias diferentes: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para gram positivo e *Escherichia coli* para gram negativo. Os géis foram diluídos e deixados em contato com soluções contendo as bactérias em suspensão pelo período de 8 minutos. Os géis classificados como biocidas, que tinham teor de etanol acima de 70% (m/m), apresentaram forte atividade antibacteriana, como esperado, enquanto os géis cosméticos, de menor teor, apresentaram desempenho inferior.

Lacerda, Oliveira e Marcante (2020) também apresentaram um método de determinação do teor de etanol em álcool gel utilizando GC-FID. A curva de calibração foi construída com quatro soluções de etanol com teor entre 2,0% e 20,0% (m/m) em n-butanol, de modo que é necessário uma etapa de diluição para preparar as amostras de álcool gel para análise. A curva obtida teve coeficiente de regressão igual a 0,9999 e um desvio padrão relativo de 5,64%. O método foi utilizado para analisar 7 amostras de álcool gel com teor declarado de 70% (m/m) obtidas de um produtor local. Alíquotas de 1g foram coletadas e diluídas na proporção de 1:10 utilizando n-butanol. Os autores notaram que o uso de balões volumétricos nessa etapa dificultava a dissolução pois o gel se aderiu às paredes da vidraria e, por isso, eles foram substituídos por frascos de tampa de abertura larga com rosca e foi necessário medir a massa de solvente adicionada para atingir a proporção correta. Devido à dificuldade em solubilizar o gel, as amostras foram preparadas de duas formas: metade foi agitada manualmente por 2 minutos e a outra metade foi submetida a banho ultrassônico por 2 minutos a 25 kHz. Todas as amostras analisadas apresentaram teor de etanol abaixo do declarado no rótulo, tendo-se obtido valores entre 53,9% (m/m) e 65,3% (m/m). Os autores sugeriram que essa diferença entre os teores declarados e os obtidos pode ser atribuída ao processo de produção, que requer longos períodos de homogeneização para incorporar o etanol à matriz de gel, o que poderia causar perdas por volatilização. Quanto ao uso do banho ultrassônico, os resultados apresentaram coeficiente de variação significativamente inferiores quando comparados aos das amostras que foram somente agitadas, fato que os autores atribuíram à natureza viscosa da matriz

da amostra que adere à superfície das vidrarias, dificultando a solubilização completa do analito. Também foi feito teste de repetitividade com 3 injeções da mesma amostra, obtendo coeficiente de variação de 1,1%, tendo os autores classificado o sistema de cromatografia como dotado de repetitividade adequada. Embora tenham afirmado que a volatilização era um parâmetro chave para explicar os produtos com teor de etanol abaixo do preconizado pela Anvisa e considerando que o método requer preparo de amostra com etapas de diluição e banho ultrassônico, esse trabalho não avaliou possíveis erros introduzidos por volatilização durante as etapas de preparo. Os autores poderiam ter realizado ensaios de recuperação para validar o modelo e verificar se essas etapas interferem na determinação do teor de etanol.

Silva *et al.* (2021) utilizaram um espectrômetro NIR portátil no intervalo de comprimento de onda de 900 a 1700 nm, associado a técnicas quimiométricas de classificação multivariada por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) e análise discriminante linear com seleção de variáveis pelo algoritmo das projeções sucessivas (SPA-LDA, do inglês *Successive Projections Algorithm – Linear Discriminant Analysis*) para construir modelos capazes de identificar amostras de álcool gel como sendo conformes ou não-conformes com o teor de etanol entre 65 e 75% (m/m). O estudo utilizou 30 amostras preparadas em laboratório com concentração de etanol entre 55 e 75% (m/m), sendo 14 consideradas conformes (entre 65 e 75% m/m) e 16 não-conformes (entre 55 e 63% m/m). Todas elas foram preparadas seguindo a metodologia recomendada pela Farmacopeia Brasileira tendo utilizado carbômero como agente gelificante, porém com a adição de glicerina. Os espectros foram pré-processados usando segunda derivada com filtro de Savitzky-Golay utilizando polinômio de segunda ordem e janela de 11 pontos. Foi feita uma análise exploratória dos dados usando PCA, na qual se observou que as amostras conformes tendiam a se agrupar devido à contribuição das variáveis nas faixas de 1100 a 1200 nm e 1400 a 1500 nm, que podem ser relacionadas ao álcool. A partir disso foram construídos os modelos de classificação PLS-DA e SPA-LDA, que apresentaram 77 e 100% de exatidão na validação cruzada, respectivamente. Os modelos foram utilizados para avaliar 7 amostras comerciais, das quais apenas 4 foram classificadas como conformes. Os autores propõem os métodos como uma forma rápida e de baixo custo para fazer a triagem de amostras de álcool gel, porém são vulneráveis a interferentes

com bandas em comprimentos de onda similares ao do etanol, o que pode levar a erros, especialmente pelo fato de serem discriminantes.

Estevão *et al.* (2021) avaliaram o uso de alcoômetros para determinação do teor de etanol em sanitizantes para as mãos a base de álcool, comparando os seus resultados com os obtidos por ressonância magnética nuclear de alta resolução em rotação no ângulo mágico como referência. Foi feito um experimento fatorial completo em que foram avaliados os efeitos de 3 componentes na formulação do gel: agente gelificante, emoliente e teor de etanol. Ao efetuar as análises com o alcoômetro, as amostras que utilizaram carbopol como espessante, que é o recomendado pela Farmacopeia Brasileira, não puderam ser analisadas diretamente devido aos parâmetros reológicos dessas amostras. Isso se deve ao fato de o gel apresentar uma rede estruturada com propriedades aproximadas à de um sólido quando submetido a tensões de cisalhamento de baixa amplitude, sendo necessário uma etapa prévia de acidificação para desfazer a estrutura do gel. Já as amostras que utilizaram os derivados celulósicos hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e hidroxietilcelulose (HEC), que apresentam menor viscosidade e parâmetros reológicos diferentes, puderam ser analisadas diretamente. Os autores afirmaram que a diluição causada no processo de acidificação pode afetar negativamente a quantificação mesmo após correção do volume, porém o uso de pequeno volume de ácido mais concentrado apresentou resultado igual ao da RMN baseado no teste *F* com intervalo de confiança de 95%. Dito isso, concluíram que o uso de alcoômetro é uma forma de controle de qualidade acessível e apropriado para análise preliminar de álcool gel. Do ponto de vista forense, a necessidade de saber qual o tipo de agente gelificante foi utilizado para efetuar o preparo de amostras correto é uma grande desvantagem, uma vez podem ocorrer apreensões em fábricas em que não há rotulagem ou que esta não condiz com os reagentes utilizados.

Thangavel *et al.* (2021) desenvolveram um método colorimétrico para monitorar a qualidade de sanitizantes para as mãos a base de álcool a partir da análise visual da separação de fases e desenvolvimento de cores com o uso de uma mistura de etanoato de butila e violeta genciana. Como o álcool gel é constituído majoritariamente por álcool e água, o método se baseia na miscibilidade da mistura binária álcool-água em etanoato de butila que depende do tipo de álcool utilizado no produto. A violeta genciana é utilizada para gerar um contraste de cores que permite diferenciar as fases, mesmo nos casos em que o produto a ser analisado possui corantes. Os testes foram

conduzidos em tubos de ensaio graduados com capacidade para 15 mL, em que são adicionados 5 mL da amostra, 1 mL de uma solução 10% (v/v) de ácido clorídrico e 0,5 mL de uma solução 0,01% (v/v) de violeta genciana. Após homogeneização, adicionou-se 5 mL de butanoato de etila e aguardou-se 10 minutos para separação das fases e desenvolvimento das cores. O resultado obtido foi comparado com padrões de cor e com uma tabela de volumes para determinar o tipo de álcool e estimar a concentração, desde que esta esteja entre 40 e 80% (v/v) ou até 90% (v/v) no caso do propanol. Acima dessa faixa não se observa separação entre as fases e é necessário diluir a amostra. Observou-se que, nas amostras contendo água e metanol, o volume da camada superior se manteve constante em $5,25 \text{ mL} \pm 0,25 \text{ mL}$ até o teor de 80% (v/v) de metanol, sendo o critério mais importante para distinguir essas amostras.

A grande limitação desse método é o fato de que ele não é capaz de detectar a presença de metanol na condição de adulterante, ou seja, em pequenas concentrações, em álcool gel a base de etanol, que seria algo de grande valia do ponto de vista prático. A presença de metanol na qualidade de componente majoritário é uma adulteração grosseira e incomum, cuja detecção pode ser feita facilmente utilizando-se espectroscopia no infravermelho médio, por exemplo. Além disso, a diferença entre as cores é muito sutil, podendo levar o analista a cometer erros, e amostras de etanol com teor de 40% (v/v) apresentam comportamento muito similar às amostras de metanol com teores entre 40 e 80% (v/v), de modo que o método é limitado por apresenta falhas na determinação da natureza e teor de álcool de forma inequívoca em determinadas faixas.

3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A região do espectro infravermelho, situada no espectro eletromagnético entre as regiões da radiação visível e das micro-ondas, engloba radiação com comprimentos de onda entre $0,78 \text{ }\mu\text{m}$ e $1000 \text{ }\mu\text{m}$, cujo equivalente em número de onda é de 12800 a 10 cm^{-1} (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2018). Devido a diferentes aplicações e instrumentações, essa região costuma ser dividida em três partes: infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), médio (MIR, do inglês *mid-infrared*) e distante (FIR, do inglês *far infrared*). A primeira região do espectro, NIR, se situa entre $0,78$ e $2,5 \text{ }\mu\text{m}$ (780 e 2500 nm), seguida pelo MIR entre $2,5$ e $50 \text{ }\mu\text{m}$ (4000

e 200 cm^{-1}). Por último, a região do infravermelho distante se situa entre 50 e $1000\text{ }\mu\text{m}$ (200 e 10 cm^{-1}) e está fora do escopo deste trabalho.

A radiação da região do infravermelho apresenta baixa energia em comparação à região do ultravioleta e visível e, portanto, quando incide em uma amostra, não fornece energia suficiente para causar transições eletrônicas nas moléculas, mas apenas transições vibracionais e rotacionais. Assim, a absorção na região do infravermelho ocorre em espécies moleculares que têm pequenas diferenças energéticas entre estados vibracionais e rotacionais.

As transições de estados vibracionais são chamadas de fundamentais quando ocorrem entre níveis vibracionais adjacentes e de sobretons quando ocorrem para níveis mais energéticos. Transições para níveis vibracionais mais elevados são menos prováveis que as fundamentais e, portanto, as bandas relativas aos sobretons são de menor intensidade (LARKIN, 2011). Além dessas bandas, também são observadas bandas de combinação quando duas ou mais vibrações fundamentais acontecem simultaneamente.

Os espectros na região do MIR apresentam bandas referentes, principalmente, a transições fundamentais e sobretons de vibrações que envolvem átomos pesados. Na região do NIR, por outro lado, estão presentes bandas relacionadas a sobretons e combinações de vibrações que envolvem átomos leves, principalmente o hidrogênio.

A espectroscopia no infravermelho tem como características a rapidez das análises, o fato de ser não-destrutiva, de demandar pouco ou nenhum preparo de amostra e de ser aplicável na análise de uma vasta gama de moléculas. Essas são características de grande importância na rotina dos laboratórios forenses, sendo comum a presença de espectrofotômetros de infravermelho médio nesses laboratórios.

3.4.1 Região do Infravermelho Médio

A espectroscopia na região do MIR é uma ferramenta capaz de auxiliar na determinação da estrutura de moléculas orgânicas. A identificação de substâncias é feita a partir da análise de diferentes regiões do espectro, iniciando pela região de frequência dos grupos (entre 3600 e 1250 cm^{-1}), usada para identificar os grupos funcionais mais comuns e a região de impressão digital (de 1200 a 600 cm^{-1}), usada para identificar compostos com base no perfil das bandas de absorção, que é

decorrente de pequenas diferenças na estrutura e composição e é único de cada molécula (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2018).

Historicamente, o uso de espectroscopia na região do MIR para fins de análise quantitativa tinha como obstáculos o fato de apresentar espectros mais complexos, bandas de absorção estreitas e as limitações dos instrumentos do tipo dispersivo em relação aos instrumentos na região do UV-visível. Além disso, quando utilizadas técnicas clássicas de calibração univariada, as sobreposições espectrais também poderiam ser fatores limitantes em muitos casos. O desenvolvimento da instrumentação, com o aparecimento de instrumentos de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*), trouxe consigo maior precisão e exatidão, além de análises mais rápidas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2018).

3.4.1.1 Refletância Total Atenuada

A refletância total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*) é uma técnica de aquisição de espectros em que a radiação infravermelha é direcionada a um cristal e interage com a amostra, os quais devem estar em perfeito contato. Esse cristal deve ter como características ser óticamente transparente à frequência da energia utilizada e possuir índice de refração elevado, superior ao dos meios a seu redor. A radiação infravermelha é totalmente refletida ao passar pelo cristal óticamente denso e atingir a interface com a amostra, meio menos denso, a um determinado ângulo de incidência denominado ângulo crítico. Apesar da refletância total, há a formação de uma onda evanescente que penetra na amostra até determinada profundidade, geralmente da ordem de poucos micrômetros e única para cada comprimento de onda, causando atenuação do feixe refletido e possibilitando a aquisição de espectros de absorção (RAMER; LENDL, 2013). Trata-se de uma técnica que requer pouco ou nenhum preparo de amostras, de modo que acessórios de ATR são comumente utilizados em espectroscopia na região do MIR.

Os espectros obtidos usando ATR são similares aos espectros de transmissão, porém não são idênticos. Isso ocorre devido a distorções que ocorrem próximo a bandas fortes de absorção em que o índice de refração da amostra pode mudar rapidamente, assim como a disposição da amostra no cristal, que pode influenciar o formato das bandas e suas intensidades relativas. Em espectros obtidos usando ATR,

a absorvância não depende da espessura da amostra, já que a radiação penetra somente alguns micrômetros nessa, porém depende do ângulo de incidência. Apesar disso, a intensidade das bandas é geralmente proporcional à concentração, o que permite o seu uso para análises quantitativas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2018).

3.4.2 Região do Infravermelho Próximo

A espectroscopia na região do NIR se baseia nas transições de estados vibracionais associados aos sobretons e bandas de combinações. As ligações químicas envolvidas costumam ser C-H, N-H, O-H e S-H (PASQUINI, 2003).

As bandas espectrais na região do NIR são normalmente largas e costumam se sobrepor, sendo raro encontrar bandas que permitam uma correlação direta com a concentração do analito, requerendo o uso de técnicas de Quimiometria. Dentre os métodos comumente utilizados para análise quantitativa, é possível citar a regressão linear múltipla, regressão por mínimos quadrados parciais, regressão por componentes principais e redes neurais artificiais.

A maioria das aplicações de análise quantitativa na região do NIR eram baseadas na utilização de equipamentos de bancada, porém tem havido grande progresso na miniaturização de espectrômetros NIR que permitiu o seu uso para diversas aplicações. Os benefícios da utilização de espectrômetros NIR portáteis estão na possibilidade de efetuar análises em qualquer local, na versatilidade de uso de diferentes interfaces e no seu baixo custo. Como desvantagens, é possível citar a menor performance ótica e janela espectral limitada. Um equipamento portátil bastante compacto e robusto que tem sido utilizado com sucesso em muitas aplicações, como na detecção de sangue em diferentes substratos (PEREIRA *et al.*, 2017), no monitoramento da produção de biodiesel (SALES *et al.*, 2019) e na avaliação da qualidade de combustíveis (SILVA *et al.*, 2019), é o VIAVI MicroNIR 1700. Esse equipamento possui um detector que cobre o intervalo de comprimento de onda entre 908 e 1676 nm, utilizando um sistema seletor da radiação baseado em filtro linear variável (LVF, do inglês *linear variable filter*) (YAN *et al.*, 2019).

3.5 QUIMIOMETRIA

Existem diversas definições de quimiometria, uma delas é a da Sociedade de Quimiometria: "A quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química". Pode-se dizer que a quimiometria é a associação da química, matemática, estatística e lógica formal para planejar ou otimizar procedimentos experimentais, extrair informações químicas relevantes dos dados e obter conhecimentos sobre sistemas químicos (MASSART *et al.*, 1997). A quimiometria tem aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento, sendo utilizada em estudos de QSAR (do inglês, *quantitative structure-activity relationship*) em química medicinal, na área de ciências ômicas e nas engenharias química e de alimentos.

Uma das áreas da quimiometria é a calibração multivariada, considerada um dos seus pilares, que consiste no desenvolvimento de modelos utilizando dados multivariados para relacionar dois grupos de variáveis: geralmente um deles contendo uma série de medições, como espectros de determinado material, e o outro grupo contendo um ou mais parâmetros, como a concentração de um analito de interesse (BRERETON, 2018). Os métodos de calibração univariados, embora fáceis de aplicar, apresentam limitações por considerarem que os valores medidos são provenientes exclusivamente do analito estudado. Nesse contexto, a análise pode ficar prejudicada em sistemas com interferentes cujos efeitos não podem ser facilmente subtraídos, sendo necessária a aplicação de técnicas que utilizam mais de uma resposta instrumental que esteja relacionada à propriedade de interesse, os métodos multivariados. Apesar das diferenças, o objetivo final da calibração multivariada é o mesmo da univariada: aplicar uma equação matemática para descrever novas amostras (FERREIRA, 2015).

Quase sempre, previamente à análise dos dados, é necessário avaliá-los e eliminar ou reduzir variações indesejáveis e que podem influenciar os resultados obtidos, o que é feito empregando-se técnicas de pré-processamento.

3.5.1 Pré-processamentos

É fundamental que a utilização das técnicas de pré-processamento seja dotada de cuidado para evitar que as alterações promovidas causem distorções nos resultados, podendo eliminar informações relevantes ou introduzir relações que não

existiam previamente (OLIVIERI, 2018). Fenômenos físicos, como diferenças no tamanho e forma de partículas sólidas, assim como de emulsões e dispersões, mudanças no caminho ótico, na sensibilidade do detector e variações de temperatura e pressão podem causar efeitos de espalhamento da radiação. Esses efeitos são dependentes do comprimento de onda e são fontes de variabilidade que não tem relevância para o modelo a ser construído, devendo, portanto, ser corrigidos (FERREIRA, 2015).

Os pré-processamentos comumente usados para espectros de infravermelho são a aplicação de derivadas, da correção do espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês *multiplicative scatter correction*) e da variação normal padrão (SNV, do inglês *standard normal variate*). Esses três tipos de pré-processamentos são voltados à correção de desvios de linha de base, que é uma característica indesejável frequentemente encontrada em espectros na região do infravermelho devido a efeitos de espalhamento da radiação. Além desses, costuma-se empregar técnicas de suavização com a finalidade de diminuir os ruídos espectrais e, portanto, melhorar a razão sinal/ruído.

3.5.1.1 Derivadas

As derivadas são utilizadas tanto na correção de efeitos aditivos, quando há um deslocamento constante da linha de base, quanto de efeitos multiplicativos, quando há uma inclinação de linha de base à medida que cresce o comprimento de onda. No primeiro caso, a correção é feita utilizando-se a primeira derivada, uma vez que a primeira derivada de uma constante é igual a zero, e no segundo caso, utilizando a segunda (OLIVIERI, 2018). Embora haja alteração do formato original dos espectros quando se aplica esse tipo de pré-processamento, a relação entre a área abaixo de um pico e a concentração é mantida, preservando a correspondência quantitativa entre as medidas espectrais e as concentrações, quando for aplicável.

A aplicação de derivadas utilizando o método de Savitsky-Golay é uma das mais populares e utiliza um filtro em que se faz o ajuste, por mínimos quadrados, de um polinômio de grau n aos $2m+1$ pontos de uma janela móvel, cujo ponto central será substituído pela derivada da função polinomial naquele ponto. A janela se desloca e o valor da derivada é calculado novamente no novo centro, repetindo o processo até que todas as janelas sejam substituídas. O valor de m precisa ser

determinado com cuidado pois janelas muito grandes (valor de m alto) resultam em distorções na curva obtida e janelas muito pequenas (valor de m baixo) podem ocasionar ruído indesejado. Devido à natureza do cálculo por janelas utilizado, serão perdidas m variáveis em cada uma das extremidades dos espectros.

3.5.1.2 Correção do espalhamento multiplicativo

A MSC, que também pode ser traduzida como correção do sinal multiplicativo, é utilizada para remover não-linearidades causadas por espalhamento devido à presença de material particulado na amostra (RINNAN *et al*, 2008). Os efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos são corrigidos utilizando-se um espectro de referência, geralmente um espectro médio. Esse pré-processamento se dá em duas etapas, a primeira é de estimativa dos coeficientes de correção, b_0 e b_1 , conforme a Equação 1, em que \mathbf{x}_i é um dos espectros a ser corrigido, \mathbf{x}_{ref} é um espectro de referência e \mathbf{e}_i é um vetor de resíduos.

$$\mathbf{x}_i = b_{0,i} + b_{1,i}\mathbf{x}_{ref} + \mathbf{e}_i \quad (1)$$

Uma vez calculados os coeficientes de correção, pode-se proceder à segunda etapa, de cálculo do espectro corrigido, \mathbf{x}_{corr} , na forma da Equação 2.

$$\mathbf{x}_{corr,i} = \frac{\mathbf{x}_i - b_{0,i}}{b_{1,i}} = \mathbf{x}_{ref} + \frac{\mathbf{e}_i}{b_{1,i}} \quad (2)$$

3.5.1.3 Variação normal padrão

A SNV também é utilizada em casos em que há interferências de espalhamento (RINNAN *et al*, 2008). O cálculo é baseado em uma equação com o mesmo formato da MSC, porém no lugar dos coeficientes de correção b_0 e b_1 da Equação 2, a Equação 3 da SNV tem os coeficientes a_0 , valor médio das intensidades do espectro, e a_1 , desvio-padrão das intensidades desse espectro, de modo que é possível afirmar que a SNV é equivalente a autoescalar cada linha da matriz original de dados.

$$\mathbf{x}_{\text{corr}} = \frac{x_i - a_0}{a_1} \quad (3)$$

3.5.2 Calibração multivariada

O processo de calibração multivariada consiste em uma série de etapas, sendo a primeira etapa a modelagem (calibração), na qual é construído o modelo; seguida da validação, na qual o modelo é testado quanto à sua capacidade preditiva e otimizado; e, por fim, da predição, na qual o melhor modelo obtido é utilizado para fazer previsões da propriedade de interesse em novas amostras (FERREIRA, 2015).

3.5.2.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Dentre os métodos de regressão linear, PLS é geralmente apresentado como a principal técnica para dados multivariados. Modelos de regressão PLS são muito robustos quando as amostras a serem preditas tem características similares às das amostras utilizadas na calibração (BRERETON, 2000). Uma das vantagens do PLS é que os erros tanto dos espectros quanto das estimativas de concentração são levados em consideração na construção dos modelos. Além disso, ele pode ser utilizado quando se detém um conhecimento parcial dos dados, como em casos em que não se sabe a composição exata das amostras.

A regressão PLS utiliza a matriz \mathbf{X} dos dados (variáveis independentes como espectros, por exemplo) e a matriz \mathbf{y} (variáveis dependentes como concentrações), buscando maximizar a correlação entre as duas. Essa relação entre as matrizes é baseada em fatores, denominados variáveis latentes (VLs), que são definidos de modo a atingir a maior explicação da variância em \mathbf{X} ao mesmo tempo em que se obtém a melhor previsão de \mathbf{y} .

A abordagem mais comumente utilizada é conhecida como método PLS1, em que a calibração é voltada para um único analito de interesse e dois conjuntos de modelos são obtidos, na forma das Equações 4 e 5. Nessas equações, \mathbf{T} corresponde à matriz de *scores*, cujas colunas representam as variáveis latentes, e a matriz \mathbf{P} e o vetor \mathbf{q} são análogos aos pesos (do inglês, *loadings*), descrevendo a forma como as variáveis em \mathbf{T} se relacionam com os dados originais. Assim, o produto de \mathbf{T} e \mathbf{P} é uma aproximação dos dados espectrais e o produto de \mathbf{T} e \mathbf{q} é uma aproximação das

concentrações. Por fim, a matriz \mathbf{E} e o vetor \mathbf{f} correspondem aos erros e representam o ruído ou informações irrelevantes contidas em \mathbf{X} e \mathbf{y} , respectivamente (BRERETON, 2000).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P} + \mathbf{E} \quad (4)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{q} + \mathbf{f} \quad (5)$$

Uma vez definidos esses dois conjuntos, os parâmetros podem ser combinados no vetor de regressão $\hat{\mathbf{b}}$ para determinar a concentração \hat{y} de um analito em amostras a serem analisadas na etapa de predição por meio da Equação 6, em que $\hat{\mathbf{b}}_0$ assume o valor da média dos valores y das amostras de calibração, quando se utilizam os dados centrados na média (NÆS *et al*, 2004). O cálculo desses parâmetros pode ser feito por meio de diversos algoritmos, dentre os quais pode-se citar NIPALS e SIMPLS.

$$\hat{y} = \hat{b}_0 + \mathbf{x}^t \hat{\mathbf{b}} \quad (6)$$

Caso se deseje modelar mais de uma propriedade, é possível utilizar uma extensão do método PLS1 que é chamada de PLS2, que tem como diferença o fato de utilizar a matriz de concentração \mathbf{C} no lugar do vetor de concentração \mathbf{c} . Essa mudança requer que os vetores de pesos também sejam alterados para uma matriz e o processo de cálculo passa a ser iterativo.

3.5.2.2 Validação e figuras de mérito

Antes de utilizar o modelo para fazer previsões em novas amostras, é necessário otimizá-lo, o que é feito na etapa de validação interna. Uma das estratégias de validação interna é a validação cruzada, um tipo de validação que utiliza as mesmas amostras utilizadas na etapa de modelagem (validação interna) e que busca identificar a presença de amostras problemáticas (anômalas) e estimar o número ótimo de fatores (FERREIRA, 2015). Outro tipo é a validação externa, na qual os valores da propriedade de interesse das amostras, as quais não foram utilizadas na etapa de modelagem, são conhecidos e comparados com os valores estimados pelo modelo.

Na calibração multivariada, uma medida do erro global do modelo é a raiz do erro médio quadrático (RMSE, do inglês *root mean square error*), o qual pode ser calculado para as etapas de calibração (RMSEC, do inglês *root mean square error of calibration*), validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross-validation*) e predição (RMSEP). O cálculo é feito utilizando a Equação 7, em que \hat{y}_i e y_i são o valor predito e o i -ésimo valor da variável dependente e n é o número de amostras nos conjuntos de validação e predição e, no caso da calibração, é igual aos graus de liberdade.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad (7)$$

Além desses erros, é possível calcular o erro percentual entre os valores preditos (\hat{y}_i) e os valores teóricos (y_i) utilizando a Equação 8 e o *Bias* (em português, viés), que pode ser utilizado como um indicativo de erros sistemáticos, calculado utilizando a Equação 9.

$$Erro\ percentual = \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \times 100\% \quad (8)$$

$$bias = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)}{N} \quad (9)$$

Uma forma de avaliar a importância de cada variável é utilizando os VIP (do inglês *variable importance in projection*) scores, que são uma estimativa da importância de cada variável na projeção calculada usando um modelo PLS (CHONG; JUN, 2005). Eles podem ser utilizados como estratégia de seleção de variáveis, pois valores próximos ou maiores que 1 indicam variáveis importantes no modelo e valores significativamente abaixo de 1 indicam variáveis menos importantes e que podem ser sujeitas à exclusão. Este critério de seleção deriva do fato de que a média dos quadrados dos VIP Scores é igual a 1. Entretanto, devido à grande diversidade na estrutura de conjuntos de dados, pode ser necessário utilizar outro valor limítrofe como critério de seleção, com a precaução de que um valor alto causará a exclusão de variáveis importantes, enquanto um valor muito baixo incluirá variáveis pouco relevantes (AKARACHANTACHOTE; CHADCHAM; SAITHANU, 2014).

No processo de validação de um método analítico, para verificar se este possui desempenho adequado para as condições nas quais será aplicado, se utiliza parâmetros estatísticos denominados figuras de mérito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Uma das abordagens que tem sido utilizada no cálculo de figuras de mérito de modelos de calibração multivariada é o sinal analítico líquido (NAS, do inglês *net analyte signal*). O NAS de um determinado analito é definido como a parte de seu espectro que é ortogonal ao espaço gerado pelos espectros dos outros constituintes (OLIVIERI; GOICOECHEA; IÑÓN, 2004).

O limite de detecção corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada experimentalmente a determinado grau de confiança e que seja possível distinguir do sinal do branco, mas que não necessariamente pode ser quantificada (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Ele pode ser calculado utilizando a abordagem NAS, por meio da Equação 10, em que s_k^* é um espectro contendo o analito k em concentração unitária e ε uma medida do ruído experimental (OLIVIERI; GOICOECHEA; IÑÓN, 2004).

$$LOD = \frac{3\|\varepsilon\|}{\|s_k^*\|} \quad (10)$$

O limite de quantificação, por outro lado, corresponde à menor concentração de analito que pode ser medida de forma quantitativa com uma incerteza máxima de 10% e pode ser calculado pela Equação 11 (SILVA *et al*, 2012).

$$LOQ = \frac{10\|\varepsilon\|}{\|s_k^*\|} \quad (11)$$

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Devido à ausência de método padrão para análise do teor de etanol em amostras de álcool em gel, foi necessário preparar amostras em laboratório com composições conhecidas para serem empregadas no conjunto de calibração e validação externa.

Como os principais componentes do álcool em gel são etanol e água, 13 amostras de soluções aquosas de etanol com concentrações entre 30 e 90% (m/m)¹ foram preparadas utilizando etanol 99,8% (QEEL), assim como 11 amostras de álcool em gel com concentrações entre 30 e 80% (m/m)². Dessas 11 amostras, 9 foram preparadas na Farmácia Escola da Universidade Federal de Pernambuco (FECDA/UFPE) utilizando etanol anidro (doado por usinas de etanol de Pernambuco e analisado pelo Laboratório de Combustíveis da UFPE), água purificada, 0,5% de carbômero 940 (Dinâmica) e aminometilpropanol (Fagron) em quantidade suficiente para obter um pH de 6 a 7. Essas amostras foram preparadas de acordo com as instruções descritas no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012), utilizando um agitador mecânico para auxiliar na dispersão do carbômero conforme apresentado na Figura 1. Como a ANVISA autorizou o uso de insumos além daqueles descritos na Farmacopeia, 2 amostras com teor de 70% (m/m) foram preparadas pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) usando etanol anidro (Transálcool), água purificada, HPMC (Denver) e glicerol (Codossal).

4.2 AQUISIÇÃO DOS DADOS

Os espectros de infravermelho foram adquiridos em duas faixas espectrais. A primeira na região do infravermelho médio (MIR), utilizando o equipamento Spectrum Two FT-IR da Perkin Elmer com acessório de reflectância total atenuada (ATR) MIRacle™ da Pike Technologies. Os espectros foram registrados no intervalo de

¹ As concentrações das soluções aquosas de etanol foram: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90% (m/m).

² As concentrações das amostras de álcool em gel foram: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 (1 amostra preparada com carbômero 940 e 2 com HPMC), 75 e 80 % (m/m).

número de onda entre 650 e 4000 cm^{-1} , com medidas de absorvância a cada 1 cm^{-1} , 4 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

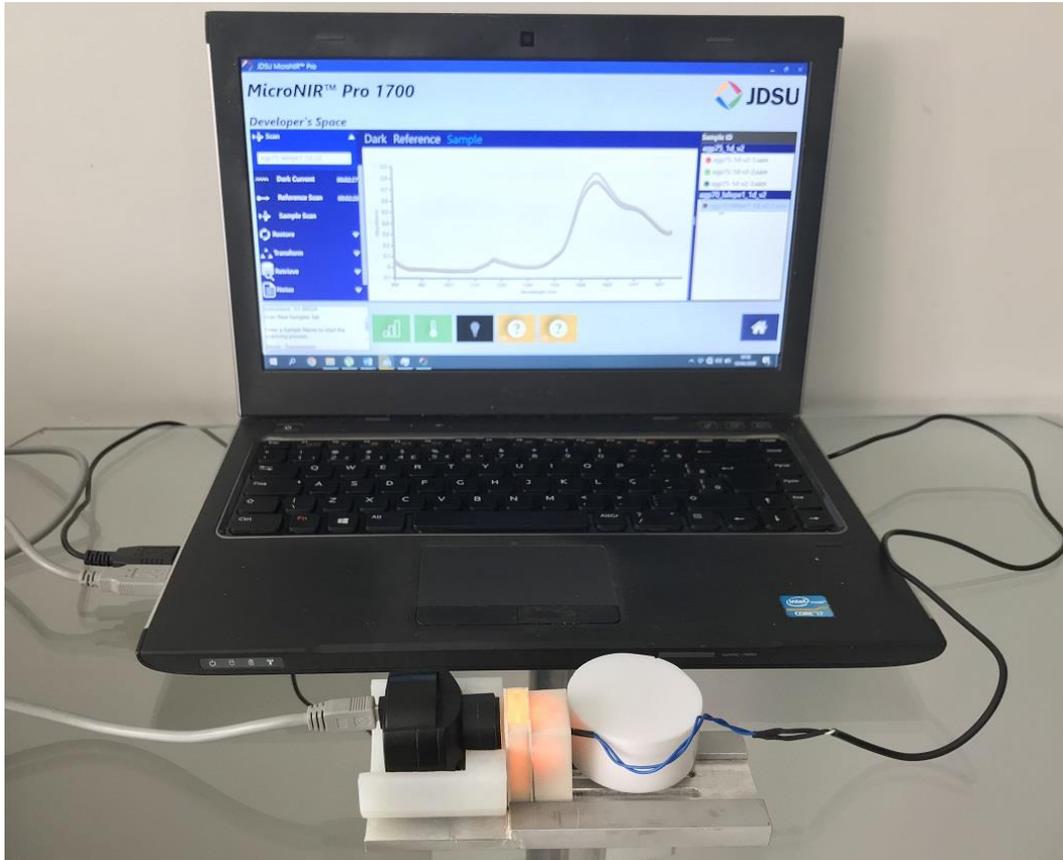
Figura 1 – Preparo de amostras de álcool gel na FECDA/UFPE.



Fonte: O autor (2021).

A segunda faixa espectral foi no infravermelho próximo (NIR), entre 908 e 1676 nm utilizando o espectrofotômetro portátil MicroNIR™ Pro 1700 da Viavi Solutions (Figura 2). Os espectros foram obtidos com medidas de absorvância a cada 6 nm, aproximadamente, 100 varreduras e tempo de integração de 12,5 ms. Os dados foram adquiridos no modo de transmitância usando um acessório baseado no que foi descrito por Paiva *et al.* (2015). Cubetas de quartzo com caminho ótico de 2 e 5 mm foram utilizadas para avaliar a melhor opção de aquisição dos espectros. Devido à viscosidade das amostras de álcool em gel, foi necessário utilizar seringas com agulha para inseri-las na cubeta de menor caminho ótico, tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas.

Figura 2 – Aparato experimental para aquisição de espectros NIR no modo de transmitância com cubeta com caminho óptico de 2mm.



Fonte: O autor (2021).

Todos os espectros foram adquiridos em triplicata (réplicas autênticas) e usados como amostras distintas nos cálculos.

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Foram avaliadas as seguintes técnicas de pré-processamento: SNV, MSC e 1ª e 2ª derivada com filtro de Savitzky-Golay (polinômio de 2ª ordem com janela de 15 pontos para os dados do infravermelho médio e de 7 pontos para os dados do infravermelho próximo). Dentre essas, a melhor técnica de pré-processamento foi selecionada com base nos melhores resultados obtidos pelos modelos de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS). Antes de efetuar os pré-processamentos, o intervalo de 650 a 790 cm^{-1} dos espectros do MIR foi excluído por apresentar ruído elevado. Assim, três tipos de modelos foram construídos, caracterizados pelas amostras presentes no conjunto de dados de calibração:

- Tipo 1: Modelos utilizando somente as amostras de soluções aquosas de etanol;
- Tipo 2: Modelos utilizando as amostras de soluções aquosas de etanol e 2 amostras de álcool gel com teores de 50% (m/m) preparada com carbômero 940 e de 70% (m/m) com HPMC;
- Tipo 3: Modelos utilizando as amostras de soluções aquosas de etanol e 4 amostras de álcool gel com teores de 50%, 70% e 80% (m/m) preparadas com carbômero 940 e de 70% com HPMC.

Na construção dos modelos de calibração, utilizou-se a validação cruzada no método aleatório com 10 conjuntos de dados de teste selecionados aleatoriamente, de modo que nenhuma amostra individual estivesse em mais de um conjunto e isso foi repetido por 5 iterações. A média dos resultados obtidos em cada iteração foi apresentada como o resultado da validação cruzada.

Para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, foi executada a validação externa utilizando as amostras de álcool gel restantes, que não foram usadas na construção dos modelos. A comparação entre os 3 tipos de modelos foi feita usando um conjunto de dados de validação com as 7 amostras não utilizadas na calibração e a comparação entre os modelos do tipo 1 e 2 usou um conjunto de 9 amostras.

Modelos univariados também foram construídos, para fins de comparação, utilizando os VIP scores como parâmetro para determinar as variáveis mais relevantes dos espectros a serem selecionadas.

O processo de tratamento dos dados foi majoritariamente desenvolvido utilizando o PLS Toolbox 8 (Eigenvector Research, Inc) no ambiente MATLAB® (MathWorks). O cálculo dos limites de detecção e de quantificação foi efetuado usando o *toolbox* MVC1, *Multivariate Calibration* 1, para MATLAB, desenvolvido por Olivieri *et al.* (2004), que utiliza o conceito de NAS para estimar figuras de mérito na calibração multivariada de primeira ordem, fornecendo como resultado um valor mínimo e máximo para cada um dos limites.

4.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Além das amostras preparadas, descritas acima, no decorrer do ano de 2020, foram adquiridas 90 amostras comerciais de álcool em gel na região metropolitana de

Recife, Pernambuco, e mais 10 amostras foram coletadas a partir de apreensões realizadas pela Polícia Civil de Pernambuco. O melhor modelo PLS de cada método foi utilizado para efetuar a predição dessas amostras.

Dentre as amostras reais analisadas, havia amostras com diferentes teores de etanol declarados nos rótulos pelos fabricantes. Na Tabela 2 estão apresentadas as quantidades de amostras de cada teor e seus respectivos números de identificação.

Tabela 2 – Distribuição de teores de etanol declarados nos rótulos das amostras reais.

Teor de etanol (% m/m)	Quantidade	Identificação
62,5	1	1
65,0	3	2 a 4
67,0	4	5 a 8
67,2	1	9
70,0	91	10 a 100

Fonte: O autor (2021).

4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Para avaliar a estabilidade de amostras de álcool gel, 03 amostras foram selecionadas. Essas amostras foram mantidas à temperatura ambiente e com as tampas fechadas, sendo abertas somente quando das análises para remoção de pequena alíquota.

O estudo foi estruturado de modo a analisar amostras diferentes usando cada um dos métodos multivariados. O método empregando a região do MIR foi utilizado para analisar uma amostra de álcool gel comercial com teor declarado no rótulo de 70% (m/m) de etanol e com as características físico-químicas e lista de ingredientes descritas na Figura 3. A composição está descrita em inglês pois é utilizada a Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) na rotulagem de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes para facilitar a identificação de qualquer ingrediente de forma clara e precisa, de forma a padronizar a nomenclatura dado que há milhares de ingredientes com mais de um nome comercial. Para essa amostra, foram feitas 35 análises no decorrer de 100 dias.

Figura 3 – Características físico-químicas e composição do gel comercial utilizado nas análises de estabilidade com o método desenvolvido com dados espectrais na região do MIR.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

Aspecto: Gel

Cor: Incolor

Odor: Característico

pH (tal qual): 6,00 – 8,00

Densidade: 0,84 – 0,86 g/cm³

Teor Alcoólico: 70,06 – 74,64° INPM

Viscosidade dinâmica (Spindle 4; 20 rpm):
8000 – 20000 cP

COMPOSIÇÃO

Aqua; Alcohol; Aloe Barbadensis Extract; Aminomethyl Propanol; Carbomer; Isopropyl Alcohol; Methylparaben; Propylparaben; Propylene Glycol; Parfum; Benzyl Salicylate; Butylphenyl Methylpropional; d-Limonene; Hexyl Cinnamal; Linalool.

Fonte: Página do fabricante (ASSEPTGEL, 2020).

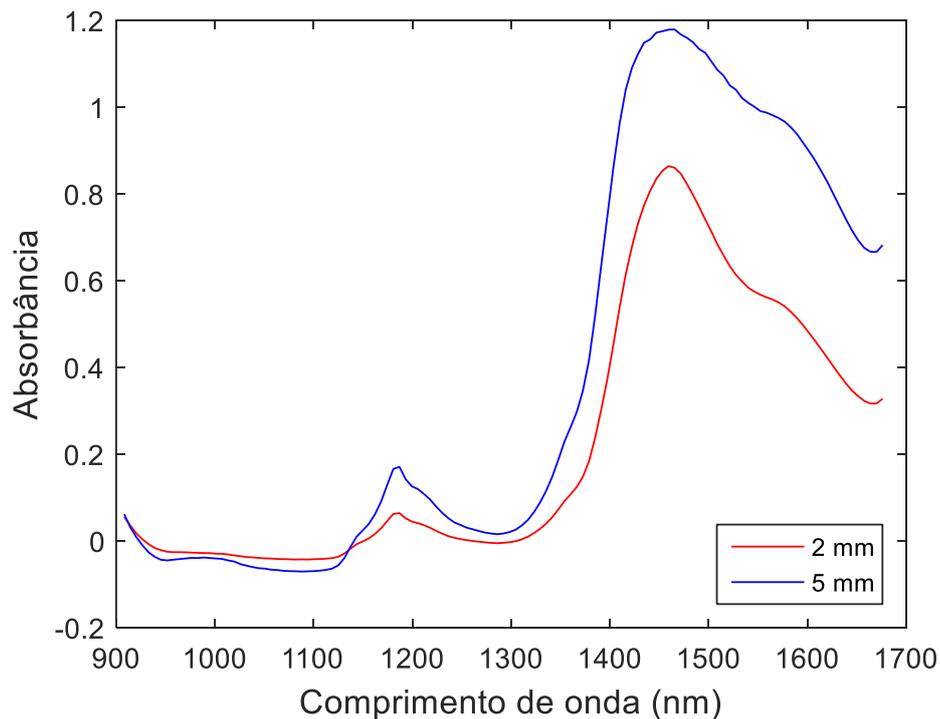
O método desenvolvido com os dados espectrais na região do NIR, por sua vez, foi utilizado para analisar uma amostra de álcool gel 70% (m/m) preparada pelo LAFEPE com HPMC e uma amostra de álcool gel 75% (m/m) preparado na Farmácia Escola de Pernambuco com carbopol. Para essas amostras foram feitas 20 análises no decorrer de 105 dias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DO CAMINHO ÓTICO PARA O NIR

No desenvolvimento do método empregando a espectroscopia na região do NIR, foi necessário determinar o caminho ótico a ser utilizado. Para tanto, foram adquiridos espectros de amostras de soluções aquosas de etanol utilizando cubetas de 2 e 5 mm, que estão apresentados na Figura 4. A cubeta de caminho ótico de 5 mm apresentou valores de absorbância elevados, com sinais de saturação na região entre 1400 e 1500 nm, e, portanto, a cubeta de 2 mm foi selecionada para as demais análises deste trabalho.

Figura 4 – Espectros brutos na região NIR de amostra de solução aquosa de etanol 70% utilizando cubetas de 2 e 5 mm.



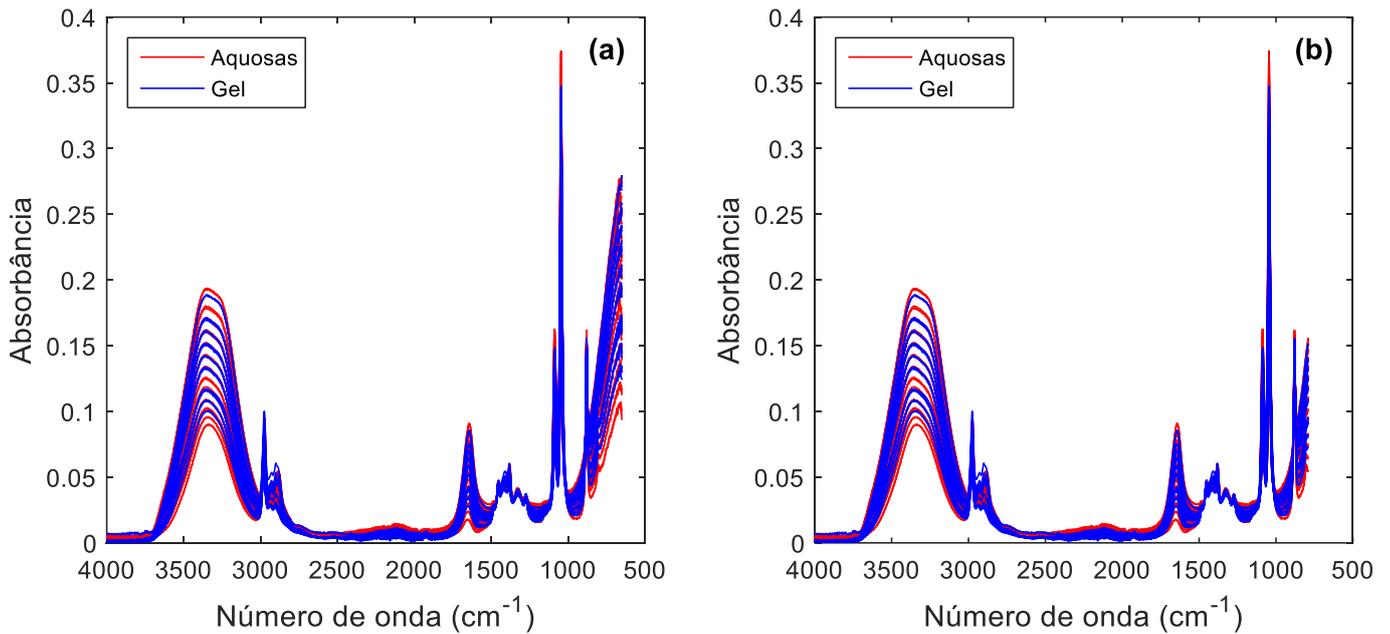
Fonte: O autor (2021).

5.2 ESPECTROS E ATRIBUIÇÃO DE BANDAS

As amostras preparadas em laboratório foram analisadas em ambas as regiões espectrais e seus espectros brutos podem ser visualizados na Figura 5 para a região do MIR e na Figura 6 para a região do NIR. Nos espectros na região do MIR, foi

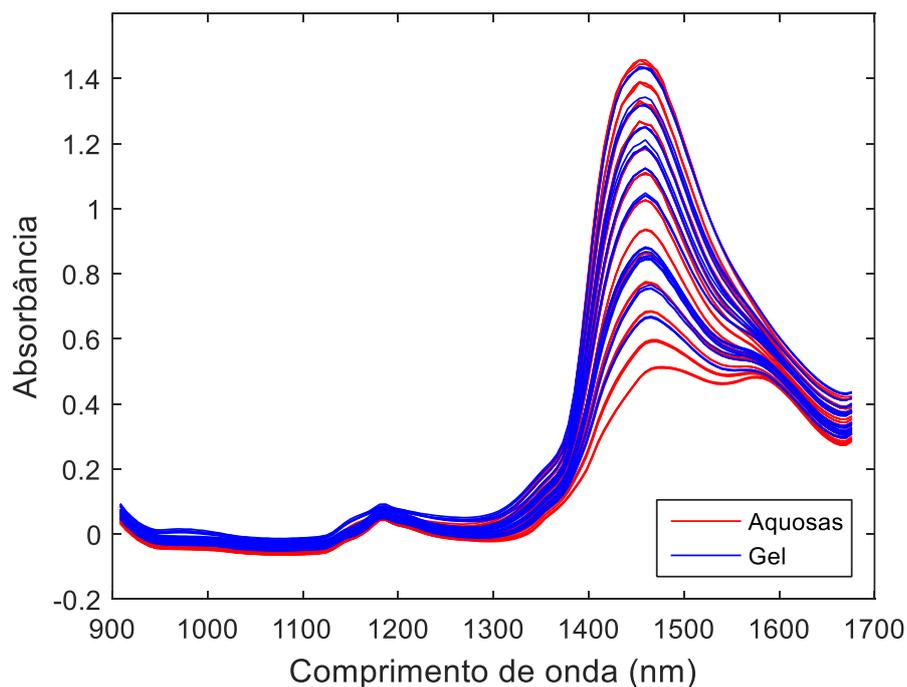
observada a existência de uma região ruidosa entre 650-790 cm^{-1} como pode ser visto na Figura 5a. Esse intervalo foi removido e os espectros resultantes, apresentados na Figura 5b, foram utilizados para construção e validação dos modelos.

Figura 5 – Espectros brutos na região MIR das amostras preparadas em laboratório: (a) completo e (b) após remoção de região ruidosa.



Fonte: O autor (2021).

Figura 6 – Espectros brutos na região NIR das amostras preparadas em laboratório.



Fonte: O autor (2021).

Na região MIR, observa-se que a mistura de água e etanol apresenta bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação de hidrogênio intermolecular ($3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$), estiramento da ligação C-H ($2980\text{ e }2885\text{ cm}^{-1}$), deformações angulares da molécula de água (1640 cm^{-1}) e da ligação C-H ($1380\text{ e }1455\text{ cm}^{-1}$) e estiramento da ligação C-O ($1085, 1045\text{ e }880\text{ cm}^{-1}$) (LARKIN, 2011).

Na região NIR, as bandas mais características do etanol e água são a banda de combinação envolvendo os modos de estiramento da molécula de água (1460 nm) e a banda de combinação da hidroxila (1580 nm) (WORKMAN; WEYER, 2012).

5.3 MODELOS DE REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Os dados espectrais pré-processados foram utilizados para construir os três tipos de modelos de regressão PLS, cujos resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3. A escolha dos melhores modelos foi feita utilizando o teste de F com nível de confiança de 95% para comparar os valores de RMSEP e, nos casos de diferenças não significativas, foram adotados como critérios de escolha o número de variáveis latentes, de modo a obter modelos que sejam mais parcimoniosos, e os valores de erro médio absoluto de predição, que é o somatório dos erros calculados pela Equação 7 para todas as amostras. Os valores dos *bias* também foram considerados. Os modelos escolhidos como os melhores de cada tipo estão em destaque na Tabela 3.

Comparando-se os modelos contendo amostras de álcool gel (tipo 2 e 3) com os modelos que contêm somente amostras de soluções aquosas de etanol (tipo 1), observou-se que essa adição de amostras de álcool gel na etapa de calibração causou uma diminuição significativa dos erros de predição. Portanto, pode-se concluir que o aumento da variabilidade ao introduzir amostras de gel foi eficaz em melhorar a capacidade preditiva dos modelos perante amostras de álcool gel. Entretanto, a diferença entre os valores de RMSEP dos modelos do tipo 2 e 3 não é significativa, segundo o teste F com 95% de confiança, e a diferença entre o erro médio absoluto de predição foi de apenas 0,01% para o MIR e 0,13% para o NIR. Ou seja, a adição de mais 2 amostras de gel no modelo do tipo 3 não teve efeito capaz de justificar a utilização dessas amostras a mais na construção do modelo. Dessa forma, os modelos do tipo 3 foram abandonados nas discussões subsequentes. Com isso, as 2 amostras a mais que foram utilizadas nos modelos tipo 3 foram transferidas para o

conjunto de validação externa, que passou a contar com 9 amostras nas comparações entre os modelos dos tipos 1 e 2.

Tabela 3 – Modelos de regressão PLS com 7 amostras no conjunto de predição, com destaque nos selecionados como melhores de cada tipo.

Método	Modelo	Pré-processamento	VL	RMSECV (% m/m)	RMSEP (% m/m)	Bias de predição	R ² de predição	Erro médio absoluto de predição (%)
MIR	Tipo 1	1ª der	3	0,40	1,50	1,28	0,9973	2,73
		2ª der	4	0,52	1,52	1,41	0,9986	3,02
		MSC	4	0,44	1,15	-0,81	0,9980	1,93
		SNV	3	0,45	1,12	-0,45	0,9965	1,82
	Tipo 2	1ª der	4	0,44	0,87	0,54	0,9981	1,45
		2ª der	4	0,53	1,02	0,75	0,9980	1,77
		MSC	3	0,51	0,59	0,15	0,9989	1,09
		SNV	4	0,45	1,09	0,69	0,9969	2,04
	Tipo 3	1ª der	5	0,44	0,88	0,43	0,9978	1,59
		2ª der	5	0,56	0,81	0,51	0,9987	1,40
		MSC	3	0,55	0,60	0,20	0,9990	1,08
		SNV	3	0,62	0,95	0,39	0,9968	1,70
NIR	Tipo 1	1ª der	3	0,31	1,51	1,29	0,9986	3,06
		2ª der	4	0,77	1,30	1,01	0,9983	2,49
		MSC	3	0,57	1,81	0,91	0,9906	3,34
		SNV	2	0,70	1,67	1,25	0,9946	2,87
	Tipo 2	1ª der	4	0,37	1,35	1,04	0,9981	2,62
		2ª der	6	0,31	0,99	0,71	0,9989	1,82
		MSC	4	0,68	1,25	-0,15	0,9938	2,09
		SNV	3	0,52	1,34	1,04	0,9972	2,52
Tipo 3	1ª der	4	0,42	1,03	0,74	0,9970	1,96	
	2ª der	6	0,33	0,81	0,48	0,9987	1,48	
	MSC	3	0,96	1,25	0,80	0,9970	2,35	
	SNV	3	0,66	1,29	0,96	0,9972	2,50	

Fonte: O autor (2021).

Nessa nova configuração, as predições foram refeitas e os resultados obtidos estão dispostos no Apêndice B, com os melhores resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Melhores modelos de regressão PLS dos tipos 1 e 2 com 09 amostras na predição.

Método	Modelo	Pré-processamento	VL	RMSECV (% m/m)	RMSEP (% m/m)	Bias de predição	R ² de predição	Erro médio absoluto de predição (%)
MIR	Tipo 1	SNV	3	0,45	0,99	-0,33	0,9969	1,47
	Tipo 2	MSC	3	0,51	0,76	-0,07	0,9984	1,12
NIR	Tipo 1	2ª Derivada	4	0,77	1,38	0,5	0,9962	2,34
	Tipo 2	MSC	4	0,68	1,18	-0,28	0,9950	1,83

Fonte: O autor (2021).

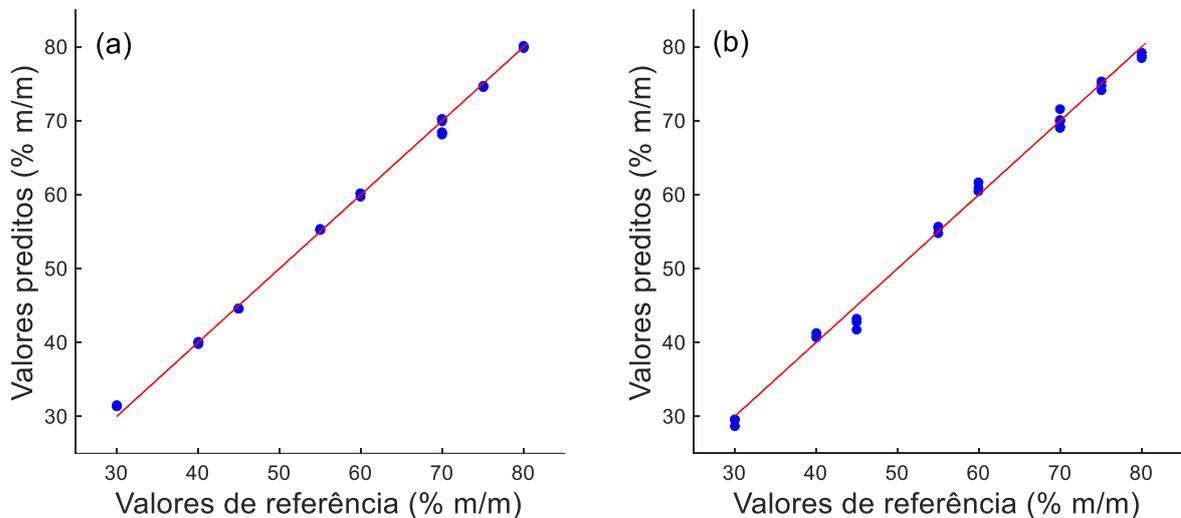
Novamente ficou explícito que os modelos tipo 2 foram melhores que os do tipo 1. Apesar dos valores de RMSEP entre esses modelos não terem sido significativamente diferentes segundo o teste F com 95% de confiança, houve redução nos valores de bias e erro médio absoluto de predição. Ao comparar os modelos do tipo 2 na região do MIR e NIR entre si, nota-se que o modelo na região do NIR apresentou erros de predição maiores e os valores de RMSEP foram significativamente diferentes. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que foi utilizado um equipamento portátil para as medidas na região do NIR, equipamento esse que possui resolução espectral limitada. Porém, essa resolução limitada é compensada pelo menor custo do equipamento e pela possibilidade de efetuar as análises em campo, o que permite a realização de análises em fábricas clandestinas, por exemplo.

As curvas dos valores preditos *versus* referência para os modelos PLS do tipo 2 construídos com os espectros nas regiões do MIR e NIR estão apresentadas na Figura 7, em que se observa que os valores preditos estão próximos da bissetriz do quadrante (linha vermelha) em todo o intervalo de concentração usado na calibração.

A título de comparação, Pasquini *et al.* (2020) obtiveram valor de RMSEP de 0,96% (m/m) em um modelo de regressão PLS baseado em espectros adquiridos com um equipamento de NIR portátil de baixo custo usando soluções aquosas de etanol e amostras de álcool gel no conjunto de calibração (modelo misto). Embora o erro obtido pelos autores tenha sido menor do que o obtido nesse trabalho no modelo NIR do tipo 2, os valores não foram significativamente diferentes, de acordo com o teste F com 95% de confiança. Vale ressaltar que todas as amostras de álcool gel utilizadas por eles no modelo citado apresentavam a composição padrão descrita na Farmacopeia

Brasileira, enquanto o modelo NIR tipo 2 construído neste trabalho possuía amostras contendo gelificante a base de celulose (HPMC) tanto no conjunto de calibração, quanto no de predição. A inserção desse tipo de amostra pode causar aumento dos erros de predição, porém tem como benefício introduzir maior variabilidade ao modelo, o que tende a melhorar a qualidade das predições futuras.

Figura 7 – Curva de valores preditos *versus* referência do conjunto de predição usando os modelos PLS tipo 2 nas regiões (a) MIR e (b) NIR.



Fonte: O autor (2021).

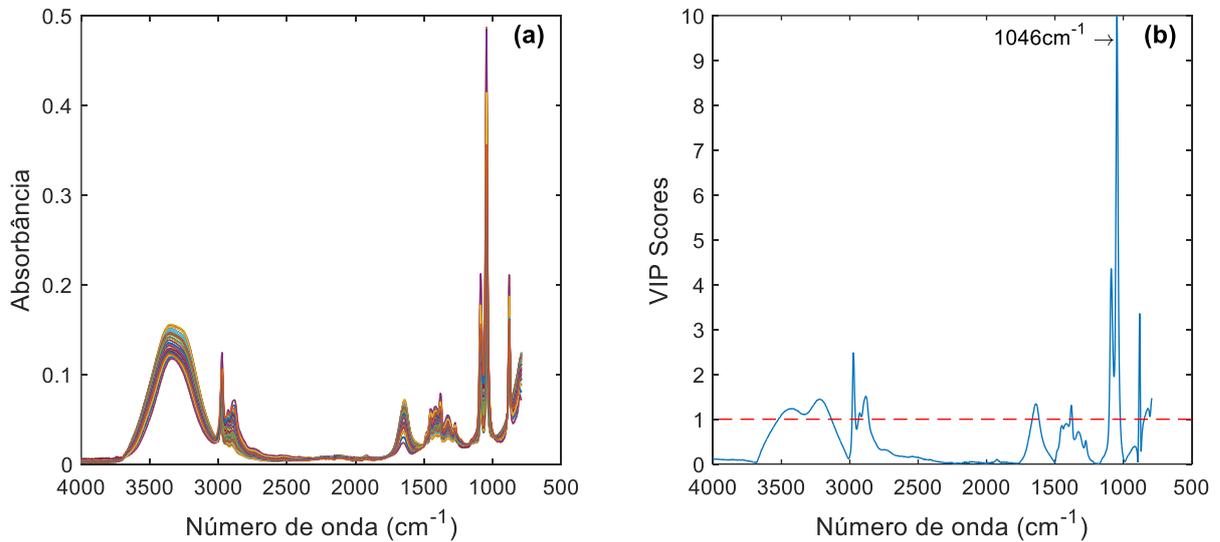
5.4 CONSTRUÇÃO DE MODELOS UNIVARIADOS

Para a construção de modelos univariados, foram utilizados os *VIP scores* para determinar o número ou comprimento de onda a ser usado para cada método, baseado nos melhores modelos do tipo 2. Os gráficos dos espectros pré-processados e dos *VIP scores* podem ser visualizados nas Figuras 8 e 9, para as regiões do MIR e NIR respectivamente. Nos gráficos dos *VIP scores*, as linhas pontilhadas vermelhas correspondem aos limiares de significância.

Com base nesses *scores*, foram escolhidas as variáveis com os maiores valores de significância. Assim, selecionou-se o número de onda de 1046 cm^{-1} para construção dos modelos univariados na região do MIR e os dois comprimentos de onda com maior significância para os modelos na região do NIR, de $1422,23$ e $1589,48$ nm, com o intuito de avaliar qual dos dois apresentava melhor desempenho. Embora seja utilizada somente uma variável para construir os modelos, deve-se adquirir o

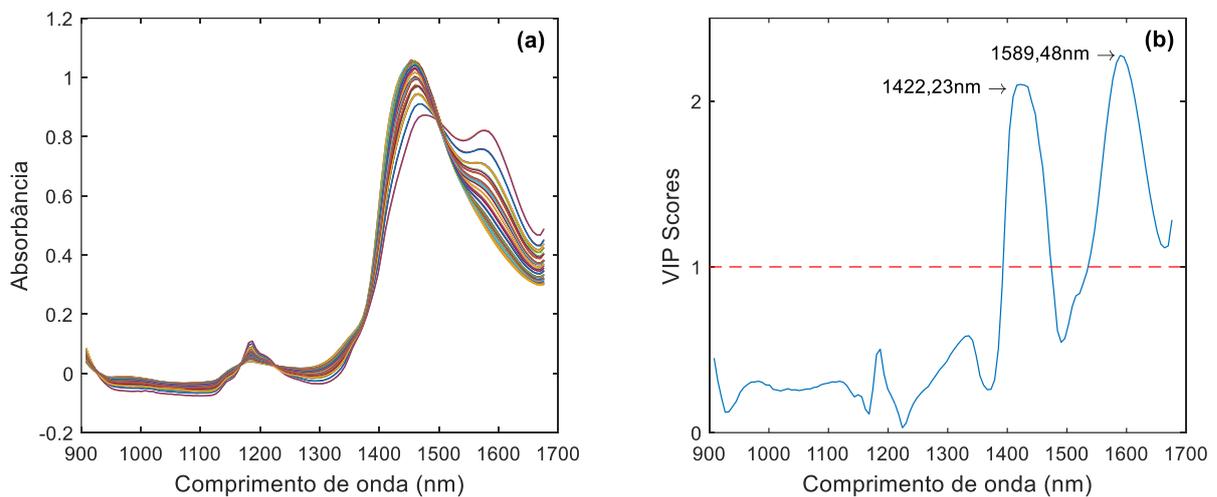
espectro inteiro, ou então um intervalo, para que se possa aplicar o pré-processamento.

Figura 8 – Gráficos de (a) dados pré-processados usando o MSC e (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do MIR.



Fonte: O autor (2021).

Figura 9 – Gráficos de (a) dados pré-processados usando o MSC (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do NIR.

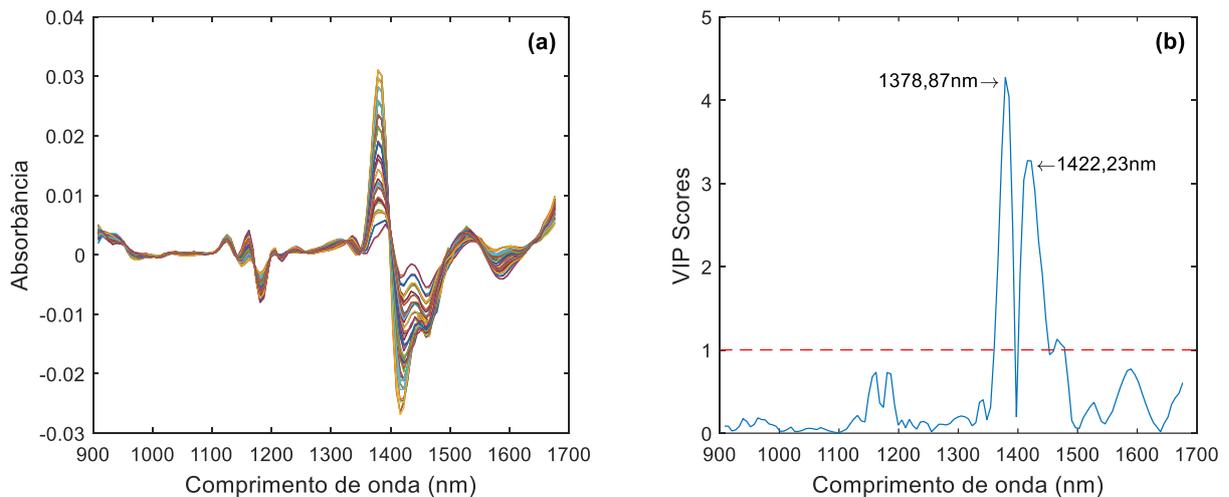


Fonte: O autor (2021).

No caso do infravermelho próximo, apesar de o melhor pré-processamento determinado na etapa anterior desse trabalho ter sido o MSC, os modelos univariados construídos com os dados utilizando esse pré-processamento não foram lineares. Portanto, usou-se a 2ª derivada para os dados na região do NIR, que foi o pré-

processamento que obteve o segundo melhor resultado nos modelos multivariados. Os gráficos dos espectros pré-processados e dos VIP scores para esse pré-processamento estão apresentados na Figura 10. Nessa configuração, foram escolhidos os comprimentos de onda de 1378,87 e 1422,23 nm para a construção dos modelos.

Figura 10 – Gráficos de (a) dados pré-processados usando a 2ª derivada e (b) dos VIP scores para os modelos construídos com os espectros adquiridos na região do NIR.



Fonte: O autor (2021).

Os resultados dos modelos univariados estão apresentados na Tabela 5 e as curvas analíticas e dos valores preditos *versus* referência estão apresentadas nas Figuras 11 e 12. Os valores de RMSEP dos modelos na região NIR são significativamente diferentes, segundo o teste F com 95% de confiança, e, portanto, o melhor modelo foi considerado como sendo o construído com o comprimento de onda de 1378,87 nm. Comparando-se os valores de RMSEP dos modelos nas regiões MIR e NIR, tem-se que esses não foram significativamente diferentes.

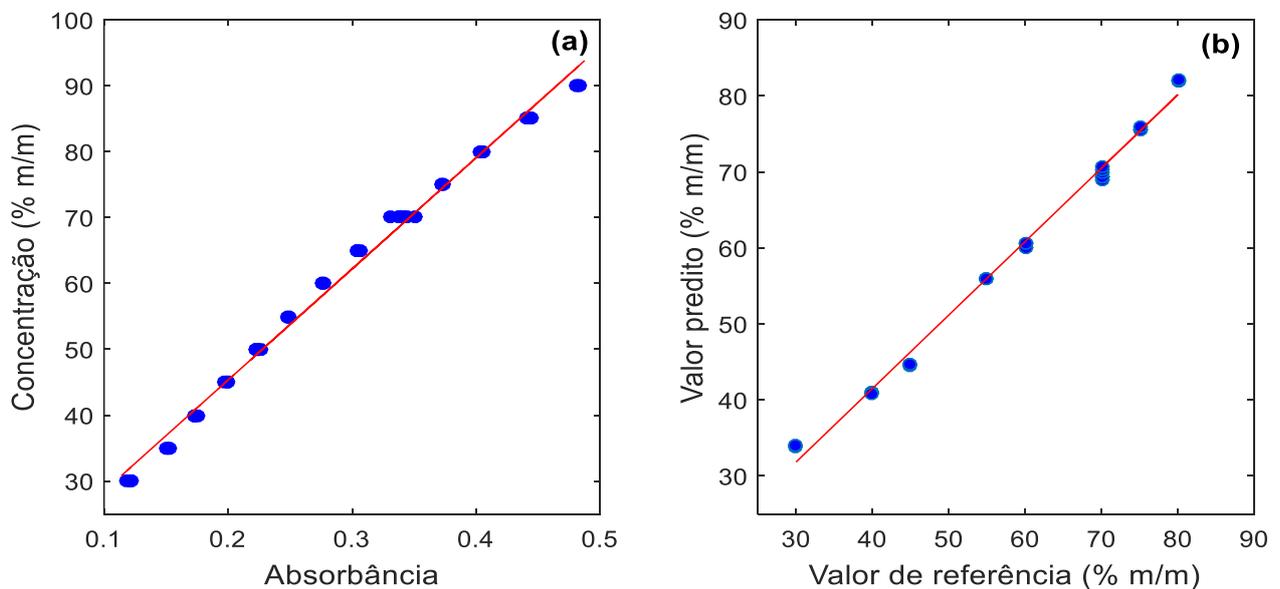
Tabela 5 – Modelos univariados.

Método	Pré-processamento	Comprimento (nm) ou número de onda (cm ⁻¹)	R ²	RMSEP (% m/m)	Bias de predição	R ² de predição	Erro médio absoluto de predição (%)
MIR	MSC	1046 cm ⁻¹	0,9928	1,61	0,9	0,9939	2,64
NIR	2ª Der	1378,87 nm	0,9991	1,21	0,71	0,9967	2,08
NIR	2ª Der	1422,23 nm	0,9978	1,83	0,76	0,9899	2,86

Fonte: O autor (2021)

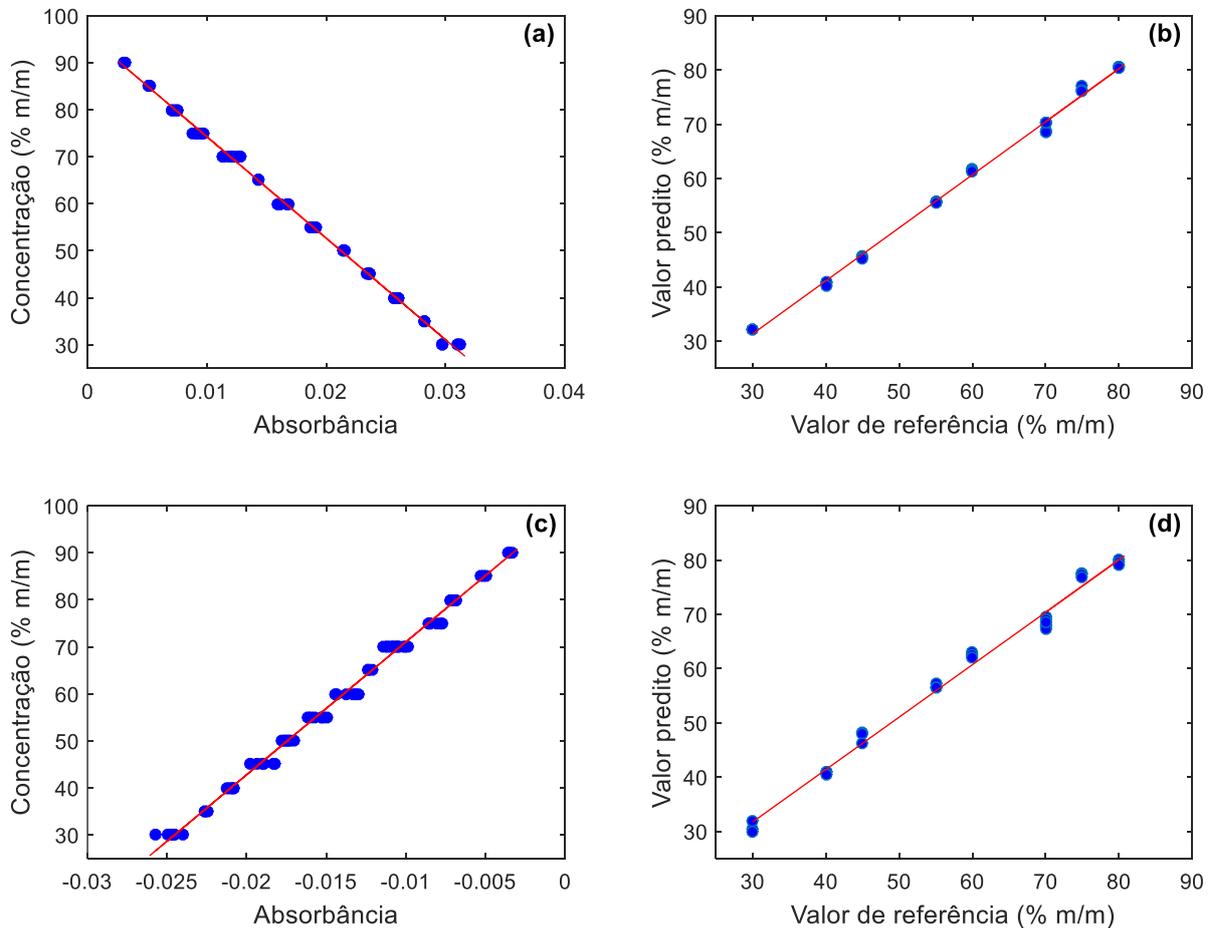
Comparando-se os resultados dos modelos univariados com os multivariados, tem-se que os valores de RMSEP, erro médio absoluto de predição e *bias* foram todos superiores nos univariados. Com relação aos valores de RMSEP, segundo o teste F com 95% de confiança, tem-se que os valores são significativamente diferentes apenas para os modelos na região MIR. Apesar disso, os erros não são altos o suficiente para inviabilizar o uso dos modelos univariados em situações em que não houver disponibilidade de modelos multivariados. Isso fica claro ao analisar as curvas de valores preditos *versus* referência apresentadas nas Figuras 11b e 12b e compará-las às dos modelos multivariados da Figura 7, pois a distribuição das amostras é similar. Contudo, usar somente uma variável faz com que a análise de amostras de álcool em gel comerciais, especialmente aquelas com composições diferentes da preconizada pela Anvisa, possa ser prejudicada. Isso porque a presença de substâncias interferentes, não consideradas na etapa de construção do modelo, pode causar maiores alterações nos teores calculados pelo modelo em modelos univariados do que em modelos PLS.

Figura 11 – Modelos univariados construídos na região do MIR: (a) curva analítica e (b) curva de valores preditos *versus* referência.



Fonte: O autor (2021).

Figura 12 – Modelos univariados construídos na região do NIR em 1378,87 nm: (a) curva analítica e (b) curva de valores preditos *versus* referência; e em 1422,23 nm: (c) curva analítica e (d) curva de valores preditos *versus* referência.



Fonte: O autor (2021).

5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS

Os limites de detecção e quantificação estimados utilizando o MVC-1 para os melhores modelos construídos com os dados espectrais na região do MIR (tipo 2, MSC, 3 VLs) e NIR (tipo 2, MSC, 4 VLs) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação dos modelos PLS.

Método	Limite de detecção mínimo	Limite de detecção máximo	Limite de quantificação mínimo	Limite de quantificação máximo
MIR	0,79	1,43	2,36	4,28
NIR	1,14	1,41	3,41	4,23

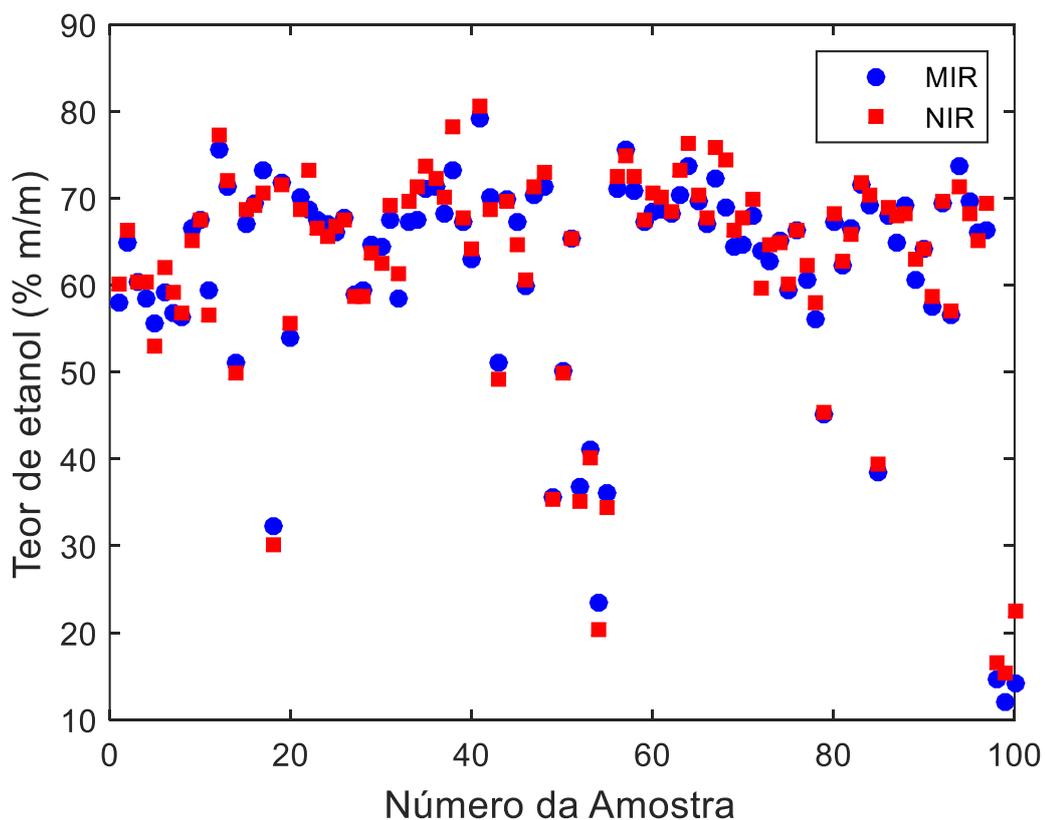
Fonte: O autor (2021)

As estimativas dos limites estão em um patamar de teor de etanol muito abaixo do esperado para amostras de álcool gel, que são da ordem de mais de 15 vezes maiores tendo em vista a regulamentação vigente dos órgãos de vigilância sanitária para amostras de produtos à base de álcool. Assim, os métodos apresentam limites adequados para a análise deste tipo de amostra.

5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS

As amostras reais foram analisadas utilizando os melhores modelos multivariados do tipo 2, apresentados na Tabela 4, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13 e, de forma numérica, no Apêndice C.

Figura 13 – Resultado de amostras reais usando os modelos construídos nas regiões do MIR e NIR.



Fonte: O autor (2021).

A amostra cujo rótulo indicava teor de 62,5% (m/m), as 4 amostras de 65% (m/m) e a amostra de 67,2%, todas apresentaram teor dentro do intervalo permitido pela ANVISA, que é de até 10% em relação ao valor do rótulo. Das 4 amostras de

67% (m/m), 3 apresentavam teor dentro do intervalo permitido, sendo que a quarta amostra estava dentro do teor somente segundo o resultado dos modelos construídos com dados espectrais na região do NIR.

Das 91 amostras analisadas cujo rótulo indicava teor de etanol de 70% (m/m), 26 amostras (ou 28,6%) estavam abaixo do valor especificado no rótulo empregando ambos os métodos, já considerando a variação de até 10% em relação ao valor de rótulo permitida pela ANVISA. Dentre as 65 aprovadas, 5 apresentavam teor acima do mínimo permitido somente em um dos métodos.

Foi observado que as amostras de número 54, 98, 99 e 100 apresentaram teores de etanol abaixo do limite inferior do intervalo de calibração dos modelos, de modo que os resultados obtidos nesses casos são uma extrapolação dos modelos.

5.7 DIFERENÇAS ENTRE AS PREDIÇÕES DOS MÉTODOS DE NIR E MIR

Além de observar métricas como RMSEP e erro médio absoluto de predição, as diferenças entre os resultados obtidos nas previsões usando os melhores modelos de cada uma das regiões empregadas é um fator importante a ser avaliado, pois foi observado que determinadas amostras estavam com teor abaixo de permitido segundo um método e acima segundo o outro. Essas diferenças foram calculadas e usadas para construir o histograma apresentado na Figura 14.

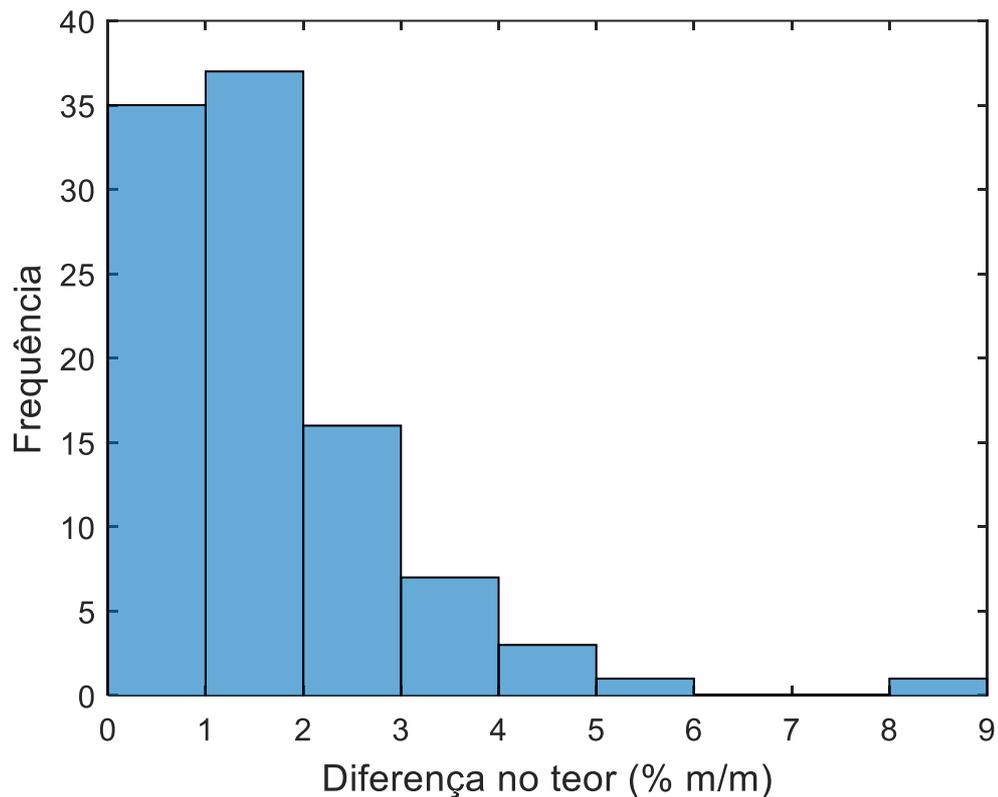
A maioria das amostras (72%) demonstrou diferença de teor de etanol entre os métodos de até 2% (m/m). Há ainda, uma quantidade considerável (23%) de amostras cuja diferença foi de 2 a 4% (m/m). Diferença acima de 4% (m/m) foi observada somente em 5% das amostras.

Quanto à amostra em que foi observada uma diferença de teor de 8% (m/m) entre os métodos, esta foi uma amostra cujo teor predito estava abaixo do limite inferior do intervalo usado na calibração e isso pode explicar por que houve esta grande variação entre os resultados dos métodos.

Com o intuito de avaliar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos, foi feito um teste t pareado excluindo-se as 4 amostras que apresentaram teor abaixo do limite inferior do intervalo de calibração, tendo-se observado que os resultados obtidos foram significativamente diferentes. Apesar disso, como os erros são inferiores a 2% (m/m) na maioria dos casos, admite-se que os métodos podem ser utilizados para a avaliação de álcool gel no Brasil. Isso porque

a Anvisa estabeleceu que é aceitável uma variação de até 10% (m/m) no teor de etanol em relação ao valor descrito no rótulo, exceto no caso específico de produtos para serviços de saúde, em que a norma prevê maior rigor com valor mínimo tolerado de 68,5% (m/m).

Figura 14 – Distribuição de frequência da diferença de teor calculado entre os métodos multivariados na região MIR e NIR.

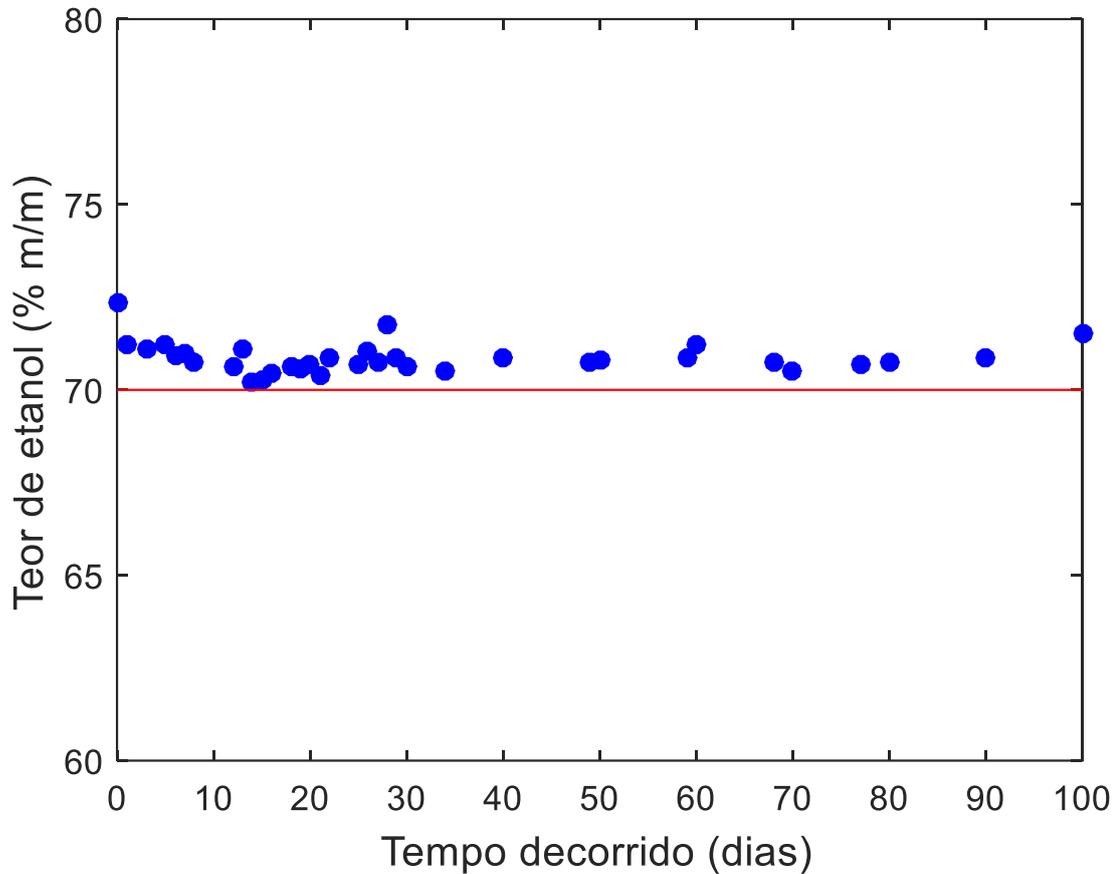


Fonte: O autor (2021).

5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O resultado do estudo de estabilidade realizado empregando o modelo construído na região do MIR com uma amostra comercial está apresentado na Figura 15 e, de forma numérica, no Apêndice D. A linha horizontal vermelha foi adicionada no gráfico no valor de 70% (m/m) que era o indicado no rótulo. Observou-se que o teor de etanol determinado pelo método estava ligeiramente acima do teor descrito no rótulo e não apresentou decréscimo significativo com o decorrer dos dias, variando entre 70,2% e 71,8% (m/m).

Figura 15 – Análise de estabilidade no MIR de uma amostra comercial de 70% (m/m).

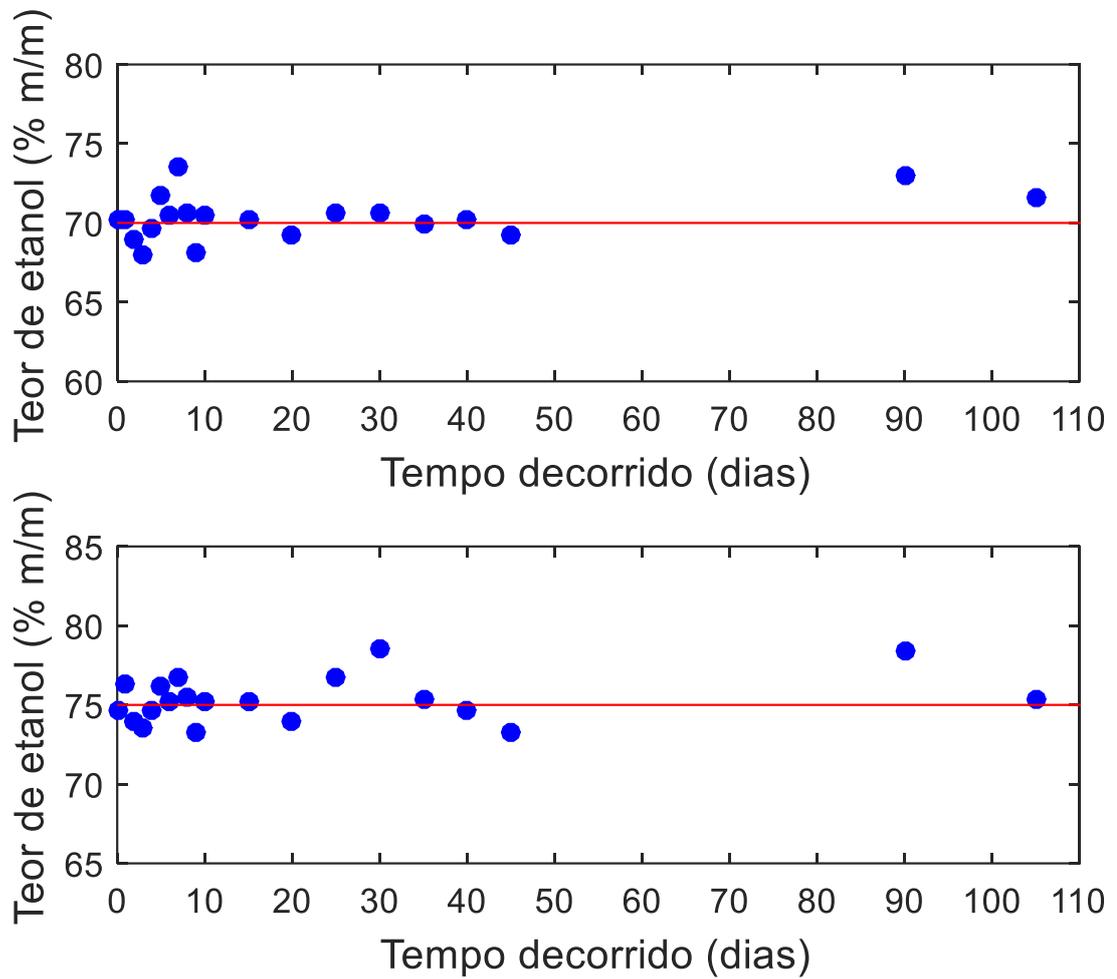


Fonte: O autor (2021).

Os resultados do estudo de estabilidade realizados empregando o modelo construído com os dados espectrais na região do NIR com duas amostras, a primeira de 70% (m/m) preparada com HPMC e a segunda de 75% (m/m) preparada com carbopol, estão apresentados na Figura 16 e, de forma numérica, no Apêndice E. Linhas horizontais vermelhas foram adicionadas aos gráficos nos valores de 70% e 75% (m/m) para indicar as concentrações com que as amostras foram preparadas. Observou-se que os teores de etanol determinados pelo método não apresentaram decréscimos significativos com o decorrer dos dias. Para a primeira amostra, os valores variaram entre 68,0% e 73,5% (m/m). Já para a segunda amostra os valores variaram entre 73,2% e 78,6% (m/m).

Como pode ser visto, não houve variação significativa dos teores de etanol das amostras analisadas. Esses resultados permitem concluir que as amostras se mantêm estáveis no intervalo de 100 e 105 dias, respectivamente.

Figura 16 – Análise de estabilidade de duas amostras no NIR: (a) 70% (m/m) produzida com HPMC e (b) 75% (m/m) produzida com carbopol.



Fonte: O autor (2021).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos para a determinação do teor de etanol em amostras de álcool gel baseados na espectroscopia no infravermelho médio e próximo. Esses métodos foram desenvolvidos num contexto em que os órgãos de controle, polícias e agências regulatórias necessitavam de meios para garantir a qualidade dos produtos comercializados em meio a pandemia de COVID-19. Isso porque, diante do aumento da demanda por sanitizantes, foi observado o aparecimento de produtos de baixa qualidade e produzidos de maneira clandestina. Necessitava-se, portanto, de métodos rápidos, de fácil aplicação e que, preferencialmente, não necessitassem da aquisição de novos equipamentos por parte das instituições regulatórias.

Foram, então, construídos 24 modelos de regressão PLS e observou-se que a adição de amostras de gel no conjunto de calibração promoveu uma melhora nos erros de predição e *bias* quando comparado aos modelos que continham somente amostras de soluções aquosas de etanol. Os modelos selecionados como melhores apresentaram valores de RMSEP de 0,76 e 1,18% (m/m) nas regiões do MIR e NIR, respectivamente. Além disso, esses modelos apresentaram limites de quantificação estimados em valores abaixo de 5% (m/m), demonstrando que são adequados para a análise de amostras de álcool em gel. Além dos modelos multivariados, foram construídos modelos univariados que, apesar de terem apresentado valores de RMSEP, erro médio absoluto de predição e *bias* superiores, podem ser utilizados em situações em que não houver disponibilidade de modelos multivariados.

O teor de etanol de 100 amostras comerciais adquiridas na região metropolitana de Recife e apreendidas pela Polícia Civil de Pernambuco foi determinado usando os melhores modelos PLS dos dois métodos e, dentre as amostras analisadas, 32% apresentavam teor de etanol inferior ao mínimo permitido pela ANVISA em pelo menos um dos métodos, levando em consideração a variação aceita pela Anvisa de até 10% em relação ao valor indicado no rótulo. Esse é um resultado preocupante e que reforça a necessidade de monitoramento e fiscalização constante por parte dos órgãos responsáveis.

Por fim, foi avaliada a estabilidade de amostras de álcool gel de 70 e 75% e não foi observada variação significativa no teor de etanol no decorrer de mais de 90

dias, indicando que a concentração se mantém estável em condições normais de armazenamento nesse período avaliado.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas para continuidade do projeto, propõe-se:

- Construir modelos univariados utilizando outros pré-processamentos e variáveis;
- Ampliar o estudo de estabilidade incluindo tempos maiores, uma vez que não foi detectada alteração significativa durante os 3 primeiros meses, e avaliar a estabilidade em frascos abertos;
- Avaliar a capacidade preditiva dos modelos em amostras preparadas utilizando outros gelificantes;
- Desenvolver estratégias para disseminar o uso dos modelos no âmbito forense como, por exemplo, a criação de uma interface gráfica.

REFERÊNCIAS

AKARACHANTACHOTE, Noppamas; CHADCHAM, Seree; SAITHANU, Kidakan. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v. 94, n. 3, p. 307-322, jul. 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do Paciente - Higienização das Mãos**. Brasília: Anvisa, 2009. 95 p. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/paciente_hig_maos.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira**. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2012. 224 p. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-nacional/arquivos/8065json-file-1>>. Acesso em: 4 ago. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 46**, de 20 de fevereiro de 2002. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0046_20_02_2002.html> Acessado em: 04 de ago. de 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 42**, de 25 de outubro de 2010. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0042_25_10_2010.html> Acessado em: 04 de ago. de 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 347**, de 17 de março de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-347-de-17-de-marco-de-2020*-250404851> Acessado em: 04 de ago. de 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 350**, de 19 de março de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-347-de-17-de-marco-de-2020*-250404851> Acessado em: 04 de ago. de 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 422**, de 16 de setembro de 2020. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-422-de-16-de-setembro-de-2020-277906952>> Acessado em: 04 de ago. de 2021.

ASSEPTGEL. **Informações técnicas ASSEPTGEL CRISTAL**, 2020. Disponível em: <<https://asseptgel.com.br/wp-content/uploads/2020/04/FT-ASSEPTGEL-GEL-ANTISSEPTICO-CRISTAL.pdf>>. Acesso em: 27 jun. de 2021.

BERARDI, Alberto; PERINELLI, Diego R.; MERCHANT, Hamid A.; BISHARAT, Lorina; BASHETI, Iman A.; BONACUCINA, Giulia; CESPI, Marco; PALMIERI, Giovanni F.. Hand sanitisers amid CoViD-19: A critical review of alcohol-based products on the market and formulation approaches to respond to increasing demand. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 584, p. 119431, 2020.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras

providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 137, n. 18, p. 1-2, 27 jan. 1999.

BRERETON, Richard G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2125-2154, 2000.

BRERETON, Richard G. **Chemometrics: Data Driven Extraction for Science**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018. 464 p.

CHONG, Il-Gyo; JUN, Chi-Hyuck. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, n. 1-2, p. 103-112, jul. 2005.

EGGERSTEDT, Sven. Comparative efficacy of commercially available alcohol-based hand rubs and World Health Organization-recommended hand rubs. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 472-474, maio 2013.

ESTEVIÃO, Priscila; COLODI, Franciely; CARMO, Lucas do; SANTOS, Maria de Fátima; BARISON, Andersson; D'OCA, Caroline; NAGATA, Noemi; FREITAS, Rilton de. Alcoholmeter as a Simple and Accessible Way for Ethanol Determination in Alcohol-Based Hand Sanitizers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 6, p. 1239-1248, fev. 2021.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. **FDA updates on hand sanitizers consumers should not use**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-hand-sanitizers-consumers-should-not-use>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

FERNANDES, Heitor L.; RAIMUNDO JUNIOR, Ivo M.; PASQUINI, Celio; ROHWEDDER, Jarbas J. R.. Simultaneous determination of methanol and ethanol in gasoline using NIR spectroscopy: effect of gasoline composition. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 804-810, 15 maio 2008.

FERREIRA, Márcia M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. 1. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 496 p.

FONSECA JUNIOR, Fernando S.; BRITO, Lívia R.; PIMENTEL, Maria F.; LEAL, Leila. Determination of Ethanol in Gel Hand Sanitizers Using Mid and Near Infrared Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 9, p. 1759-1763, jun. 2020.

JANSEN, Kerri. How we know disinfectants should kill the COVID-19 coronavirus. **Chemical & Engineering News**, 2020. Disponível em: <<https://cen.acs.org/biological-chemistry/infectious-disease/How-we-know-disinfectants-should-kill-the-COVID-19-coronavirus/98/web/2020/03>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

LACERDA, João P.A.; OLIVEIRA, Sandra S.; MARCANTE, Amanda. A rapid and effective method for determination of ethanol content in hand sanitizers (alcohol gel). **Revista IPT Tecnologia e Inovação**, v. 4, n. 14, p. 105421, 2020.

LARKIN, P. J. **IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation**. 1. ed. Waltham: Elsevier, 2011. 230 p.

MASSART, Luc D.; VANDEGINSTE, Bernard G. M.; BUYDENS, Lutgarde. M. C.; JONG, Sijmen DE; LEWI, Paul J.; SMEYERS-VERBEKE, Johanna. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1997. 886 p.

MENDES, Leonardo S.; OLIVEIRA, Flavia C. C.; SUAREZ, Paulo A. Z.; RUBIM, Joel C.. Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-

near infrared and FT-Raman spectrometries. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, n. 2, p. 219-231, out. 2003.

OLIVIERI, Alejandro C. **Introduction to Multivariate Calibration**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018. 243 p.

OLIVIERI, Alejandro C.; GOICOECHEA, Héctor C.; IÑÓN, Fernando A. MVC1: an integrated matlab toolbox for first-order multivariate calibration. **Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems**, v. 73, n. 2, p. 189-197, out. 2004.

PAIVA, Eduardo M.; ROHWEDDER, Jarbas J. R.; PASQUINI, Celio; PIMENTEL, Maria F.; PEREIRA, Claudete F. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. **Fuel**, v. 160, p. 57-63, nov. 2015.

PASQUINI, Celio. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, abr. 2003.

PASQUINI, Celio; HESPANHOL, Maria C.; CRUZ, Kaíque A. M. L.; PEREIRA, Alexandre F. Monitoring the quality of ethanol-based hand sanitizers by low-cost near-infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105421, 2020.

PEREIRA, Danilo A.; PAES, André L. G.; PACHECO, Marcos T. T.; SILVEIRA JR., Landulfo. Análise da concentração de etanol em amostras de álcool comerciais por espectroscopia Raman. *In: VII Encontro Nacional de Pós-Graduação, 2018, São Paulo. Anais do Encontro Nacional de Pós-Graduação*. São Paulo: UNISANTA, 2018. p. 282-286.

PEREIRA, José F. Q.; SILVA, Carolina S.; VIEIRA, Maria J. L.; PIMENTEL, Maria F.; BRAZ, André; HONORATO, Ricardo S. Evaluation and identification of blood stains with handheld NIR spectrometer. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 561-566, jul. 2017.

PITOL, Ana K.; JULIAN, Timothy R. Community Transmission of SARS-CoV-2 by Surfaces: Risks and Risk Reduction Strategies. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, p. 263-269, jan. 2021.

RAMASAMI, Ponnadurai; JHAUMEER-LAULLOO, Sabina; CADET, Frédéric; RONDEAU, Philippe; SOOPHUL, Yogaish. Quantification of alcohol in beverages by density and infrared spectroscopy methods. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 177-183, jan. 2005.

RAMER, Georg; LENDL, Bernhard. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1-27, mar. 2013.

RINNAN, Åsmund; NØRGAARD, Lars; VAN DEN BERG, Frans; THYGESSEN, Jonas; BRO, Rasmus; ENGELSEN, Søren Balling. Data Pre-processing. *In: SUN, Da-Wen. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2008. p. 29-50.

SALES, Rafaella; SILVA, Neirivaldo C.; SILVA, Josivan P.; FRANÇA, Higor H.; PIMENTEL, Maria F.; STRAGEVITCH, Luiz. Handheld near-infrared spectrometer for on-line monitoring of biodiesel production in a continuous process. **Fuel**, v. 254, p. 115680, out. 2019.

SALIK, Fabio L. M., POVH, Nanci P., Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. *In: 5º Congresso Nacional da STAB*,

1993, Águas de São Pedro. Anais do Congresso Nacional da STAB. Água de São Pedro: STAB, 1993. p. 262-266.

SIDDHARTA, Anindya; PFAENDER, Stephanie; VIELLE, Nathalie Jane; DIJKMAN, Ronald; FRIESLAND, Martina; BECKER, Britta; YANG, Jaewon; ENGELMANN, Michael; TODT, Daniel; WINDISCH, Marc P. Virucidal Activity of World Health Organization–Recommended Formulations Against Enveloped Viruses, Including Zika, Ebola, and Emerging Coronaviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 6, p. 902-906, 1 fev. 2017.

SILVA, Maurício A. M.; FERREIRA, Marcus H.; BRAGA, Jez W. B.; SENA, Marcelo M. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342-351, jan. 2012.

SILVA, Neirivaldo C.; MASSA, Ana R. C. G.; DOMINGOS, Daniela; AMIGO, José M.; REBOUÇAS, Márcio das Virgens; PASQUINI, Celio; PIMENTEL, Maria Fernanda. NIR-based octane rating simulator for use in gasoline compounding processes. **Fuel**, v. 243, p. 381-389, mai. 2019.

SILVA, Adenilton C; RIBEIRO, Livia P. D.; VIDAL, Ruth M. B.; MATOS, Wladiana O; LOPES, Gisele S. A fast and low-cost approach to quality control of alcohol-based hand sanitizer using a portable near infrared spectrometer and chemometrics. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 29, n. 3, p. 119-127, 31 mar. 2021.

SKOOG, Douglas; HOLLER, F James; CROUCH, Stanley R. **Principles of Instrumental Analysis**. 7. ed. Boston: Cengage Learning, 2018. 992 p.

SUCHOMEL, Miranda; KUNDI, Michael; PITTET, Didier; WEINLICH, Martina; ROTTER, Manfred L. Testing of the World Health Organization recommended formulations in their application as hygienic hand rubs and proposals for increased efficacy. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 328-331, maio 2012.

SUCHOMEL, Miranda; ROTTER, Martina. Ethanol in pre-surgical hand rubs: concentration and duration of application for achieving European Norm EN 12791. **Journal Of Hospital Infection**, v. 77, n. 3, p. 263-266, mar. 2011.

THANGAVEL, Shanmugam; DURGA PRASAD, Ankam; DASH, Kulamani; KUMAR, Sanjiv. Facile on-site quality monitoring of alcohol based hand sanitizers by phase separation and color development with butyl acetate-crystal violet mixture. **Microchemical Journal**, v. 169, p. 106578, out. 2021.

TODD, Ewen C. D.; MICHAELS, Barry S.; HOLAH, John; SMITH, Debra; GREIG, Judy D.; BARTLESON, Charles A. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 10. Alcohol-Based Antiseptics for Hand Disinfection and a Comparison of Their Effectiveness with Soaps. **Journal of Food Protection**, [S.L.], v. 73, n. 11, p. 2128-2140, 1 nov. 2010.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez W. B.; POPPI, Ronei J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, jul. 2009.

VAN DOREMALEN, Neeltje; BUSHMAKER, Trenton; MORRIS, Dylan H.; HOLBROOK, Myndi G.; GAMBLE, Amandine; WILLIAMSON, Brandi N.; TAMIN, Azaibi; HARCOURT, Jennifer L.; THORNBURG, Natalie J.; GERBER, Susan I.

Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 16, p. 1564-1567, 16 abr. 2020.

WHO. World Health Organization. **Guide to Local Production: WHO-recommended Handrub Formulations**. Geneva: WHO Press; 2010. 9p. Disponível em: <https://www.who.int/gpsc/5may/Guide_to_Local_Production.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2021.

WILKINSON, Martyn A. C.; ORMANDY, Kevin; BRADLEY, Christina R.; FRAISE, Adam P.; HINES, John. Dose considerations for alcohol-based hand rubs. **Journal Of Hospital Infection**, v. 95, n. 2, p. 175-182, fev. 2017.

WORKMAN JR., J.; WEYER, L. **Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. Boca Raton: CRC Press, 2012. 326 p.

YAN, Hui; XU, Yi-Chao; SIESLER, Heinz W.; HAN, Bang-Xing; ZHANG, Guo-Zheng. Hand-Held Near-Infrared Spectroscopy for Authentication of Fengdous and Quantitative Analysis of Mulberry Fruits. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-15, 27 nov. 2019.



Determination of Ethanol in Gel Hand Sanitizers Using Mid and Near Infrared Spectroscopy

Fernando S. Fonseca Jr.,^{a,b} Lívia R. e Brito,^{©*b} Maria Fernanda Pimentel^c and Leila B. Leal^d

^aDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560 Recife-PE, Brazil

^bInstituto de Criminalística Professor Armando Samico, Polícia Científica, 52031-080 Recife-PE, Brazil

^cLaboratório de Combustíveis, LITPEG, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-550 Recife-PE, Brazil

^dFarmácia Escola Carlos Drummond de Andrade, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 52171-011 Recife-PE, Brazil

Alcohol-based gel hand sanitizers became very popular during the COVID-19 (coronavirus disease 2019) pandemic. In Brazil, several irregular factories emerged requiring an efficient control by the police and regulatory agencies to guarantee product quality. This problem required a method to determine ethanol content, which led to the development of two methods employing mid and near infrared spectroscopy associated with chemometrics. Partial least squares (PLS) models were built and presented satisfactory results with mean absolute percentage error of prediction and root mean square error of prediction (RMSEP) of 1.12 and 0.76% (m/m), respectively, for mid-infrared (MIR) and 1.83 and 1.18% (m/m) for near-infrared (NIR). The analysis of commercial and seized samples of hand sanitizers showed that only 7 out of 34 samples had an ethanol content of 70% (m/m) or higher. This result reinforces the need for constant vigilance by authorities to ensure that the products have the required specifications.

Keywords: ethanol, hand sanitizers, infrared, PLS

Introduction

Due to the COVID-19 (coronavirus disease 2019) pandemic, the World Health Organization (WHO) has advised the public to clean their hands frequently to avoid contamination, causing alcohol-based gel hand sanitizers to become very popular. This has provoked a shortage of these products on the market. In order to counteract this, regulatory agencies worldwide such as the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) have issued guidelines for temporary preparation of these sanitizers by specific companies and pharmacies during this public health emergency in order to increase supply.^{1,2}

In Brazil, ANVISA has also authorized the use of different feedstock than the ones recommended in the

Brazilian Pharmacopoeia National Form. According to the Form, alcohol-based gel hand sanitizers should contain water, ethanol, carbomer 980 and triethanolamine.³ Carbomer 980 is the component responsible for the gel consistency of a hand sanitizer and can be substituted by other carbomers or cellulose derived components, such as hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and hydroxyethyl cellulose (HEC). Triethanolamine is a neutralizing agent used to adjust pH value to obtain gel consistency when using carbomers. It can be substituted by other compounds such as aminomethyl propanol (AMP) or other bases. Additional components such as glycerol may be added for skin care. Also, ANVISA requires the ethanol content to be at least 70% (m/m) and that the product must have proven antibacterial activity.⁴

Although necessary, this temporary dismissal of product registration has caused irregular producers to emerge, disregarding proper manufacturing practices

*e-mail: l.brito@ic.pe.gov.br

**APÊNDICE B – RESULTADOS DOS MODELOS COM 9 AMOSTRAS NO
CONJUNTO DE PREDIÇÃO, COM DESTAQUE NOS MODELOS SELECIONADOS
DE CADA TIPO**

Método	Modelo	Pré-processamento	VL	RMSECV (% m/m)	RMSEP (% m/m)	Bias de predição	Erro médio absoluto de predição (%)
MIR	Tipo 1	1ª der	3	0,40	1,46	1,0203	2,51
		2ª der	4	0,52	1,52	1,2520	2,72
		MSC	4	0,44	1,28	-0,9788	1,98
		SNV	3	0,45	0,99	-0,3370	1,47
	Tipo 2	1ª der	4	0,44	0,95	0,3748	1,48
		2ª der	4	0,53	1,14	0,5789	1,82
		MSC	3	0,51	0,76	-0,0708	1,12
		SNV	4	0,45	1,04	0,5493	1,84
NIR	Tipo 1	1ª der	3	0,31	1,41	1,1019	2,64
		2ª der	4	0,77	1,38	0,4987	2,34
		MSC	3	0,57	1,74	1,0396	3,04
		SNV	2	0,70	1,72	0,7977	2,75
	Tipo 2	1ª der	4	0,37	1,27	0,7731	2,30
		2ª der	6	0,31	0,95	0,4950	1,65
		MSC	4	0,68	1,18	-0,2771	1,83
		SNV	3	0,52	1,35	0,9220	2,34

**APÊNDICE C – TEORES DE ETANOL PREDITOS DAS AMOSTRAS REAIS
UTILIZANDO OS MELHORES MODELOS DO TIPO 2**

Número da amostra	MIR	Média	Desvio-padrão	NIR	Média	Desvio-padrão	Diferença
1	58,0	57,9	0,12	59,8	60,0	0,31	2,1
	58,1			59,8			
	57,8			60,5			
2	64,5	64,9	0,31	67,3	66,4	0,64	1,5
	65,1			66,1			
	65,1			65,8			
3	59,8	60,4	0,41	60,1	60,4	0,22	0,0
	60,7			60,6			
	60,7			60,6			
4	58,4	58,5	0,06	59,7	60,4	0,52	1,9
	58,5			60,8			
	58,4			60,8			
5	55,5	55,6	0,10	54,9	53,0	1,48	2,6
	55,7			52,6			
	55,7			51,4			
6	59,2	59,2	0,13	61,0	62,3	1,09	3,1
	59,0			63,6			
	59,4			62,2			
7	57,1	56,9	0,18	58,5	59,2	0,53	2,3
	57,0			59,5			
	56,7			59,7			
8	56,2	56,2	0,07	57,2	56,8	0,29	0,6
	56,1			56,5			
	56,3			56,6			
9	66,9	66,6	0,21	65,2	65,0	0,42	1,6
	66,4			65,3			
	66,7			64,4			
10	68,4	67,6	0,66	67,7	67,6	0,16	0,0
	67,5			67,4			
	66,8			67,7			
11	59,9	59,5	0,47	56,4	56,6	0,12	2,9
	59,6			56,7			
	58,8			56,6			

12	75,7	75,6	0,05	76,9	77,2	0,18	1,6
	75,6			77,2			
	75,5			77,4			
13	71,1	71,2	0,09	72,4	72,1	0,22	0,9
	71,3			72,1			
	71,2			71,9			
14	51,1	51,1	0,05	50,1	49,8	0,37	1,3
	51,1			49,3			
	51,0			50,0			
15	67,9	67,0	1,13	67,9	68,6	0,47	1,6
	67,5			69,0			
	65,3			68,8			
16	69,4	69,4	0,02	68,9	69,1	0,36	0,3
	69,4			68,9			
	69,4			69,7			
17	73,2	73,2	0,04	71,4	70,7	0,81	2,5
	73,2			69,5			
	73,3			71,1			
18	32,3	32,3	0,07	29,9	30,0	0,21	2,3
	32,2			29,9			
	32,4			30,3			
19	71,7	71,7	0,01	71,9	71,6	0,45	0,0
	71,7			71,0			
	71,7			72,0			
20	52,4	54,0	1,26	55,7	55,7	0,13	1,7
	53,7			55,6			
	55,4			55,9			
21	71,9	70,0	1,25	68,4	68,8	0,33	1,2
	70,4			68,7			
	68,8			69,2*			
22	69,0	68,8	0,41	72,6	73,3	0,52	4,5
	69,1			73,5			
	68,2			73,9			
23	67,5	67,4	0,06	65,9	66,5	0,44	0,9
	67,3			66,9			
	67,4			66,7			

24	67,0	67,0	0,03	65,0	65,5	0,39	1,5
	67,0			65,7			
	67,0			65,9			
25	66,1	66,1	0,10	67,9	66,9	0,68	0,8
	66,3			66,2			
	66,0			66,7			
26	67,7	67,7	0,12	68,5	67,6	0,61	0,1
	67,9			67,4			
	67,6			67,0			
27	58,8	58,9	0,04	58,6	58,7	0,04	0,2
	58,8			58,7			
	58,9			58,7			
28	59,5	59,4	0,03	59,9	58,8	0,79	0,7
	59,4			58,1			
	59,5			58,3			
29	64,7	64,6	0,08	63,6	63,8	0,12	0,8
	64,5			63,9			
	64,7			63,9			
30	64,6	64,5	0,10	62,4	62,6	0,21	1,9
	64,6			62,6			
	64,4			62,9			
31	67,4	67,4	0,08	68,8	69,1	0,27	1,7
	67,4			69,4			
	67,2			69,2			
32	58,0	58,5	0,35	61,2	61,4	0,19	2,9
	58,8			61,3			
	58,8			61,6			
33	67,3	67,2	0,08	69,7	69,7	0,06	2,5
	67,2			69,7			
	67,1			69,6			
34	67,4	67,5	0,04	70,1	71,2	0,73	3,7
	67,5			71,6			
	67,5			71,8			
35	71,1	71,0	0,15	73,3	73,8	0,31	2,8
	71,1			74,0			
	70,8			73,9			

36	71,3	71,2	0,09	72,0	72,3	0,22	1,1
	71,2			72,3			
	71,1			72,6			
37	68,4	68,3	0,17	70,2	70,1	0,33	1,8
	68,1			70,5			
	68,5			69,7			
38	73,2	73,3	0,09	77,9	78,1	0,50	4,8
	73,3			77,7			
	73,4			78,8			
39	67,4	67,3	0,48	67,5	67,7	0,39	0,4
	66,6			67,3			
	67,8			68,3			
40	63,1	63,0	0,05	64,0	64,1	0,27	1,1
	63,0			63,8			
	63,0			64,5			
41	79,2	79,2	0,03	80,6	80,5	0,24	1,3
	79,2			80,8			
	79,2			80,2			
42	70,1	70,1	0,06	68,9	68,8	0,09	1,2
	70,0			68,9			
	70,1			68,7			
43	51,2	51,1	0,14	48,9	49,1	0,18	1,9
	51,1			49,2			
	50,9			49,3			
44	70,5	69,9	0,73	70,3	69,6	0,49	0,3
	70,4			69,3			
	68,9			69,2			
45	67,1	67,3	0,12	64,2	64,6	0,29	2,7
	67,4			64,7			
	67,3			64,9			
46	59,9	59,8	0,05	60,5	60,7	0,28	0,9
	59,8			60,6			
	59,8			61,1			
47	70,3	70,3	0,10	71,0	71,3	0,21	1,0
	70,4			71,4			
	70,1			71,5			

48	71,6	71,4	0,16	72,7	73,0	0,25	1,6
	71,2			73,0			
	71,4			73,3			
49	35,7	35,6	0,07	35,0	35,4	0,49	0,2
	35,7			36,1			
	35,5			35,2			
50	50,1	50,1	0,02	49,5	49,8	0,19	0,3
	50,1			49,9			
	50,1			49,9			
51	65,4	65,3	0,12	64,9	65,3	0,49	0,0
	65,4			66,0			
	65,2			65,1			
52	36,8	36,7	0,03	34,6	35,1	0,40	1,6
	36,7			35,3			
	36,7			35,6			
53	40,9	41,1	0,13	40,0	40,2	0,18	0,8
	41,1			40,3			
	41,2			40,4			
54	23,5	23,5	0,04	19,7	20,3	0,52	3,2
	23,4			20,3			
	23,5			20,9			
55	35,8	36,0	0,16	34,1	34,3	0,20	1,6
	36,2			34,6			
	35,9			34,3			
56	70,9	71,0	0,10	72,1	72,5	0,25	1,5
	71,1			72,7			
	70,9			72,6			
57	75,5	75,6	0,05	74,2	74,9	0,51	0,6
	75,6			75,4			
	75,5			75,2			
58	70,8	70,9	0,05	72,7	72,4	0,40	1,5
	70,9			72,6			
	70,9			71,8			
59	67,6	67,3	0,30	66,7	67,5	0,57	0,2
	67,5			67,9			
	66,9			68,0			

60	68,5	68,4	0,04	70,0	70,5	0,44	2,0
	68,4			71,1			
	68,4			70,4			
61	68,7	68,6	0,16	70,0	70,0	0,22	1,5
	68,3			70,3			
	68,6			69,8			
62	68,3	68,3	0,11	67,8	68,4	0,43	0,1
	68,4			68,6			
	68,2			68,8			
63	70,6	70,3	0,54	73,1	73,2	0,14	2,8
	70,8			73,3			
	69,6			73,0			
64	73,5	73,6	0,11	75,6	76,3	0,51	2,8
	73,7			76,9			
	73,5			76,5			
65	70,0	69,7	0,43	70,1	70,3	0,31	0,6
	69,1			70,1			
	70,0			70,7			
66	66,8	67,1	0,19	67,5	67,8	0,20	0,8
	67,1			68,0			
	67,2			68,0			
67	72,4	72,2	0,17	75,8	75,8	0,17	3,6
	72,0			76,0			
	72,2			75,6			
68	68,9	68,9	0,20	74,7	74,3	0,50	5,4
	68,7			73,6			
	69,2			74,7			
69	63,4	64,3	0,67	65,4	66,3	0,66	1,9
	64,7			66,4			
	64,8			67,0			
70	64,6	64,6	0,04	67,1	67,8	0,68	3,2
	64,6			67,6			
	64,5			68,7			
71	67,9	67,9	0,01	69,5	69,8	0,24	1,9
	67,9			70,1			
	67,9			69,8			

72	64,0	64,0	0,02	59,5	59,7	0,18	4,3
	64,0			59,7			
	64,0			59,9			
73	63,0	62,8	0,25	64,7	64,7	0,05	1,8
	63,0			64,6			
	62,5			64,7			
74	65,2	65,1	0,08	64,7	64,9	0,17	0,2
	65,0			65,0			
	65,2			65,1			
75	58,9	59,3	0,33	59,5	60,0	0,38	0,7
	59,5			60,2			
	59,6			60,3			
76	66,3	66,2	0,08	66,5	66,4	0,30	0,1
	66,1			66,7			
	66,3			65,9			
77	60,8	60,7	0,10	61,6	62,2	0,45	1,5
	60,6			62,4			
	60,6			62,6			
78	56,1	56,1	0,00	57,4	57,9	0,32	1,8
	56,1			58,1			
	56,1			58,1			
79	45,1	45,1	0,06	44,8	45,4	0,51	0,4
	45,1			45,4			
	45,0			46,1			
80	66,9	67,2	0,21	68,0	68,2	0,59	1,0
	67,4			69,0			
	67,2			67,6			
81	62,4	62,4	0,03	62,9	62,8	0,29	0,4
	62,4			63,1			
	62,3			62,4			
82	66,6	66,5	0,11	66,5	65,9	0,47	0,5
	66,5			65,4			
	66,3			65,9			
83	71,4	71,4	0,01	72,2	71,9	0,64	0,4
	71,4			72,4			
	71,4			71,0			

84	69,4	69,2	0,29	70,0	70,3	0,25	1,1
	68,8			70,6			
	69,4			70,3			
85	38,1	38,4	0,21	38,9	39,4	0,55	1,0
	38,4			40,2			
	38,6			39,1			
86	67,9	67,9	0,05	69,5	69,0	0,34	1,1
	67,9			68,7			
	67,8			68,9			
87	64,8	64,9	0,17	68,5	68,0	0,37	3,1
	64,8			67,6			
	65,1			67,8			
88	69,0	69,1	0,06	68,2	68,2	0,04	0,9
	69,1			68,3			
	69,0			68,2			
89	61,4	60,7	0,90	62,0	63,2	0,98	2,5
	59,4			63,4			
	61,3			64,4			
90	64,2	64,2	0,00	64,3	64,2	0,13	0,0
	64,2			64,0			
	64,2			64,2			
91	57,6	57,4	0,15	58,6	58,8	0,22	1,4
	57,4			59,1			
	57,2			58,7			
92	69,7	69,3	0,28	69,8	69,7	0,46	0,4
	69,0			70,2			
	69,1			69,1			
93	56,6	56,6	0,11	56,7	57,1	0,57	0,5
	56,4			56,7			
	56,7			57,9			
94	73,2	73,6	0,27	71,0	71,2	0,18	2,4
	73,8			71,4			
	73,8			71,3			
95	69,8	69,7	0,03	67,7	68,2	0,42	1,5
	69,7			68,7			
	69,7			68,2			

96	66,1	66,0	0,08	64,7	65,0	0,46	1,1
	66,1			64,6			
	65,9			65,6			
97	66,2	66,4	0,14	69,4	69,3	0,15	2,9
	66,5			69,5			
	66,5			69,1			
98	14,6	14,7	0,04	15,6	16,5	0,69	1,8
	14,7			17,3			
	14,7			16,5			
99	12,0	12,0	0,06	15,2	15,3	0,21	3,3
	12,0			15,1			
	12,1			15,6			
100	14,4	14,2	0,19	22,4	22,6	0,82	8,5
	14,0			21,7			
	14,1			23,7			

**APÊNDICE D – RESULTADOS DA ANÁLISE DE ESTABILIDADE COM O
MÉTODO NA REGIÃO DO MIR**

Dias decorridos	Teor de etanol	Teor médio	Desvio-padrão
0	72,3	72,3	0,03
	72,3		
	72,4		
1	71,2	71,2	0,02
	71,2		
	71,3		
3	71,1	71,1	0,04
	71,1		
	71,1		
5	71,0	71,2	0,16
	71,4		
	71,3		
6	71,0	70,9	0,10
	70,8		
	70,9		
7	70,9	71,0	0,11
	71,1		
	71,1		
8	70,8	70,7	0,04
	70,7		
	70,7		
12	70,6	70,6	0,02
	70,7		
	70,6		
13	71,2	71,1	0,06
	71,0		
	71,2		
14	70,2	70,2	0,02
	70,2		
	70,2		
15	70,3	70,3	0,03
	70,3		
	70,2		

16	70,3	70,4	0,06
	70,5		
	70,5		
18	70,6	70,7	0,01
	70,7		
	70,6		
19	70,6	70,6	0,06
	70,6		
	70,5		
20	70,8	70,7	0,10
	70,8		
	70,5		
21	70,1	70,4	0,24
	70,6		
	70,6		
22	70,9	70,9	0,03
	70,8		
	70,9		
25	70,7	70,7	0,04
	70,7		
	70,6		
26	71,1	71,1	0,06
	71,0		
	71,1		
27	70,7	70,8	0,06
	70,8		
	70,8		
28	71,7	71,8	0,02
	71,8		
	71,8		
29	70,9	70,9	0,04
	70,8		
	70,9		
30	70,7	70,6	0,02
	70,6		
	70,6		

34	70,5	70,5	0,01
	70,5		
	70,5		
40	70,9	70,9	0,08
	70,7		
	70,9		
49	70,7	70,8	0,05
	70,8		
	70,7		
50	70,8	70,8	0,02
	70,8		
	70,8		
59	70,9	70,9	0,04
	70,9		
	70,8		
60	71,2	71,2	0,03
	71,2		
	71,2		
68	70,7	70,7	0,02
	70,7		
	70,8		
70	70,6	70,5	0,09
	70,5		
	70,4		
77	70,8	70,7	0,11
	70,7		
	70,5		
80	70,8	70,7	0,03
	70,8		
	70,7		
90	70,9	70,9	0,01
	70,9		
	70,9		
100	71,5	71,5	0,08
	71,6		
	71,4		

**APÊNDICE E – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ESTABILIDADE COM O
MÉTODO NA REGIÃO DO NIR**

Dias decorridos	Teor de etanol 1	Teor médio 1	Desvio-padrão 1	Teor de etanol 2	Teor médio 2	Desvio-padrão 2
0	75,3	74,7	0,48	69,1	70,2	1,02
	74,1			70,0		
	74,7			71,6		
1	77,1	76,3	0,55	70,2	70,2	0,03
	75,9			70,2		
	75,9			70,3		
2	73,6	74,4	1,03	68,5	68,9	0,41
	73,7			68,9		
	75,9			69,5		
3	72,5	73,5	0,70	67,3	68,0	1,21
	73,7			67,0		
	74,2			69,7		
4	74,6	74,6	0,07	70,4	69,6	0,90
	74,6			70,1		
	74,7			68,4		
5	76,7	76,2	0,58	71,8	71,8	0,05
	75,4			71,9		
	76,5			71,8		
6	74,8	75,2	0,26	70,2	70,5	0,20
	75,4			70,5		
	75,3			70,7		
7	77,0	76,8	0,42	73,8	73,5	0,56
	77,2			72,7		
	76,2			74,0		
8	76,1	75,5	0,40	70,2	70,6	0,29
	75,2			70,9		
	75,2			70,7		
9	73,2	73,2	0,66	67,5	68,1	0,43
	72,3			68,5		
	74,0			68,3		
10	75,4	75,2	0,14	70,3	70,5	0,33
	75,0			70,3		
	75,2			71,0		

15	75,2	75,2	0,15	70,0	70,2	0,36
	75,4			70,0		
	75,0			70,8		
20	74,1	73,9	0,13	69,4	69,3	0,13
	73,8			69,5		
	73,9			69,2		
25	77,4	76,8	0,55	70,1	70,6	0,39
	76,9			70,7		
	76,1			71,1		
30	78,7	78,6	0,16	69,9	70,6	0,57
	78,3			70,5		
	78,7			71,3		
35	75,5	75,3	0,17	70,0	69,9	0,05
	75,3			69,9		
	75,1			69,9		
40	74,9	74,7	0,43	72,0	70,2	1,27
	75,1			69,2		
	74,1			69,4		
45	73,0	73,2	0,43	69,6	69,2	0,51
	73,9			69,6		
	72,9			68,5		
90	78,5	78,4	0,23	72,7	72,5	1,50
	78,5			70,6		
	78,0			74,3		
105	75,5	75,4	0,10	72,0	71,6	0,28
	75,3			71,3		
	75,4			71,6		