



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE  
TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
TRABALHO DE GRADUAÇÃO**

**ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA APLICADO AO TEMPO DE VIDA  
DE PRATELEIRA**

**DAVID GIOVANI MARINI**

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Engenharia Química da  
Universidade Federal de São Carlos.

**ORIENTADORA:** Prof. Adriana Paula Ferreira Palhares

**SÃO CARLOS – SP**

**Setembro de 2022**

## **BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de Graduação apresentado no dia 13 de setembro de 2022 perante a seguinte banca examinadora:

**Orientador:** Adriana Paula Ferreira Palhares, DEQ/UFSCar

**Convidada:** Gabriela Cantarelli Lopes, DEQ/UFSCar

**Professor da Disciplina:** Ernesto Antonio Urquieta Gonzalez, DEQ/UFSCar

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e todo suporte oferecido para realizar a graduação e inúmeras outras atividades que agregaram no meu conhecimento técnico e humano.

A todos os professores e mestres que dedicaram seu tempo ao transmitir conhecimento, indispensáveis para a minha formação.

Ao curso de Engenharia Química que proporcionou diversas experiências e desafios enriquecedores, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

A empresa WAMA Diagnóstica, que através do setor de Pesquisa e Desenvolvimento trouxe novas experiências, permitindo a mim desenvolver novas habilidades e encarar novos desafios.

Aos meus gestores que tem o grande trabalho de guiar minhas decisões em momentos de grandes desafios.

A minha orientadora técnica do setor de Pesquisa e Desenvolvimento, Ana Luísa Barcelos, pelos momentos de trocas de conhecimento técnico e pessoal, que foram cruciais nas minhas tomadas de decisão.

À equipe do setor de Pesquisa e Desenvolvimento da WAMA Diagnóstica que, mais do que troca de conhecimento me proporciona fortalecimento nos momentos desafiadores.

A minha orientadora Adriana por cada trabalho que realizamos juntos e pelas oportunidades em que pude me realizar pessoal e profissionalmente.

Aos amigos que a vida me trouxe durante minha caminhada universitária e em minha carreira profissional, que por meio de momentos e lembranças diversas vezes me motivaram a buscar novos desafios.

Ao meu amado companheiro Wagner, que pela sua parceria, amizade e companheirismo foi o meu amparo diante de inúmeras dificuldades.

E por fim, aos meus avós, Maria e Luís e à minha tia Adriana que tanto se dedicaram ao meu crescimento humano e profissional, amenizando os momentos de grandes dificuldades que enfrentei durante a minha formação.

## RESUMO

O presente estudo de estabilidade acelerada tem como objetivo simular a data de validade de um teste para detectar doença de Chagas, submetendo-o a temperaturas acima da sua temperatura de armazenamento ( $5,0^{\circ}\text{C}$ ), para acelerar sua velocidade de degradação. O estudo permite verificar se a característica funcional do teste mantém os níveis aceitáveis para o mercado, de acordo com os requerimentos da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em questões de qualidade e segurança do produto. Através dos valores experimentais de densidade óptica em função do tempo coletados, foi possível aplicar dois métodos distintos para determinação da constante cinética ( $k$ ), sendo eles: o método de análise integral e da função objetivo com análise da dispersão de dados. A partir dos valores das constantes cinéticas e das respectivas temperaturas, pode-se determinar a energia de ativação ( $E_{atv}$ ) para o complexo reacional do teste de Chagas, cujo valor foi de  $48,60\text{ kJ/mol}$ , característico para produtos da área da saúde, além de determinar o fator de aceleração  $\alpha_{10}$ , que para o teste considerado foi de  $1,32$ , menor que o estabelecido pela ANVISA, que determina um valor de  $\alpha_{10}$  igual a  $2,0$ . Nesse sentido, por meio do estudo de estabilidade acelerada concluiu-se que o cenário mais vantajoso para o referido teste é submetê-lo à temperatura ambiente, de  $25,0^{\circ}\text{C}$ , por um período de aproximadamente 133 dias, realizando testagens regulares durante esse intervalo de tempo, avaliando-o em termos de qualidade e segurança. Em caso afirmativo, os registros devem ser encaminhados à ANVISA para registro e posterior comercialização.

## ABSTRACT

The present accelerated stability study aims to simulate the expiration date of a test to detect Chagas disease, subjecting it to temperatures above its storage temperature (5.0°C), to accelerate its degradation speed. The study allows verifying whether the functional characteristic of the test maintains the levels acceptable to the market, according to the requirements of ANVISA (National Health Surveillance Agency), in matters of quality and product safety. Through the experimental values of optical density as a function of the time collected, it was possible to apply two distinct methods to determine the kinetic constant (k), which are: the method of integral analysis and the objective function with data dispersion analysis. From the values of the kinetic constants and their temperatures, it is possible to determine the activation energy (E<sub>atv</sub>) for the reactional complex of the Chagas test, whose value was 48.60 kJ/mol, characteristic for health products, in addition to determining the acceleration factor  $\alpha_{10}$ , which for the test considered was 1.32, less than that established by ANVISA, which determines a value of  $\alpha_{10}$  equal to 2.0. In this sense, through the accelerated stability study it was concluded that the most advantageous scenario for this test is to submit it at room temperature of 25.0°C for a period of approximately 133 days, performing regular tests during this time interval, evaluating it in terms of quality and safety. If so, the records should be forwarded to ANVISA for registration and subsequent marketing.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 Objetivos.....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
2.1 ANÁLISE DO TEMPO DE VIDA DE PRATELEIRA .... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	11
2.2 CINÉTICA QUÍMICA .....	12
2.3 LEIS DE VELOCIDADE .....	15
2.4 ESTABILIDADE ACELERADA.....	17
2.5 TÉCNICAS ELISA PARA TESTE DE CHAGAS.....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIAIS.....	23
3.2 EQUIPAMENTO .....	24
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
3.4 PROCEDIMENTO DE CÁLCULOS.....	26
3.4.1 MÉTODO INTEGRAL PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	26
3.4.2 MÉTODO DA FUNÇÃO OBJETIVO E DISPERSÃO DE DADOS.....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>	Diagrama de energia de ativação pictórico de uma reação exotérmica (A) e endotérmica (B)	13
<b>Figura 2.2</b>	Ilustração da sequência reacional entre antígeno – anticorpo – substrato no interior das cavidades das microplacas.	19
<b>Figura 2.3</b>	Diferenças entre sangue total, soro e plasma	19
<b>Figura 3.1</b>	Microplacas com 96 cavidades impregnadas com proteínas purificadas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	21
<b>Figura 3.2</b>	Espectrofotômetro para leitura de densidade óptica.	22
<b>Figura 4.1</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.	26
<b>Figura 4.2</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.	27
<b>Figura 4.3</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.	27
<b>Figura 4.4</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.	28
<b>Figura 4.5</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.	28
<b>Figura 4.6</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 15,0°C.	30
<b>Figura 4.7</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.	30
<b>Figura 4.8</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.	31
<b>Figura 4.9</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.	31
<b>Figura 4.10</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.	32
<b>Figura 4.11</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 25,0°C.	34

<b>Figura 4.12</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.	34
<b>Figura 4.13</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.	35
<b>Figura 4.14</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.	35
<b>Figura 4.15</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.	36
<b>Figura 4.16</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 35,0°C.	37
<b>Figura 4.17</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.	38
<b>Figura 4.18</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.	38
<b>Figura 4.19</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.	39
<b>Figura 4.20</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.	39
<b>Figura 4.21</b>	Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 5,0°C.	43
<b>Figura 4.22</b>	Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 15,0°C.	44
<b>Figura 4.23</b>	Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 25,0°C.	46
<b>Figura 4.24</b>	Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 35,0°C.	47
<b>Figura 4.25</b>	Dados de $\ln(k)$ em função de $1/T$ , de acordo com a equação de Arrhenius, para o método de análise integral	48
<b>Figura 4.26</b>	Dados de $\ln(k)$ em função de $1/T$ , de acordo com a equação de Arrhenius, para o método da função objetivo.	50

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 3.1</b>	Relação entre as equações lineares e as ordens cinéticas	28
<b>Quadro 4.1</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo na temperatura de armazenamento de 5,0°C para o teste de Chagas ELISA.	29
<b>Quadro 4.2</b>	Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação R <sup>2</sup> para temperatura de 5,0°C	33
<b>Quadro 4.3</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo na temperatura de aceleração de 15,0°C para o teste de Chagas ELISA.	33
<b>Quadro 4.4</b>	Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação R <sup>2</sup> para temperatura de 15,0°C	36
<b>Quadro 4.5</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo na temperatura de aceleração de 25,0°C para o teste de Chagas ELISA.	37
<b>Quadro 4.6</b>	Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação R <sup>2</sup> para temperatura de 25,0°C	40
<b>Quadro 4.7</b>	Dados de densidade óptica em função do tempo na temperatura de aceleração de 35,0°C para o teste de Chagas ELISA.	41
<b>Quadro 4.8</b>	Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação R <sup>2</sup> para temperatura de 35,0°C	44
<b>Quadro 4.9</b>	Dados da função objetivo para a temperatura de armazenamento de 5,0°C.	46
<b>Quadro 4.10</b>	Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 15,0°C.	47
<b>Quadro 4.11</b>	Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 25,0°C.	49
<b>Quadro 4.12</b>	Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 35,0°C.	50
<b>Quadro 4.13</b>	Dados de temperaturas e constantes cinéticas linearizados para o método de análise integral	52
<b>Quadro 4.14</b>	Valores de energia de ativação e fator de aceleração $\alpha_{10}$ para o método de análise integral.	53
<b>Quadro 4.15</b>	Dados de temperaturas e constantes cinéticas linearizados para o método da função objetivo	53

<b>Quadro 4.16</b>	Valores de energia de ativação e fator de aceleração $\alpha_{10}$ para o método de análise integral.	54
<b>Quadro 4.17</b>	Intervalos de tempo, em dias, requerido o estudo de estabilidade acelerada, de acordo com o método de análise integral.	55
<b>Quadro 4.18</b>	Intervalos de tempo, em dias, requerido o estudo de estabilidade acelerada, de acordo com o método de análise integral.	56

## 1. INTRODUÇÃO

Quando se procura um determinado produto, encontra-se no mercado um portfólio gigantesco de marcas, que por meio do marketing visam atribuir enorme valor à sua mercadoria. Nesse contexto, para que se possa escolher a opção com o melhor custo-benefício é indispensável selecionar marcas que ofereçam segurança e qualidade, principalmente quando se trata de produtos relacionados direta ou indiretamente à nossa saúde, como alimentos, medicamentos, cosméticos, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza etc.

Para que esses produtos possam ser comercializados é necessário que eles sejam registados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão nacional, vinculado ao Ministério da Saúde e responsável pela verificação, avaliação e controle de produtos e serviços alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e correlatos, a fim de promover o controle sanitário, por meio de legislações e regulamentações técnicas que devem ser obedecidas pelas empresas. O registro de cada produto deve ser realizado em conjunto com parte regulatória da empresa e ANVISA, a qual emite uma certificação de qualidade do produto quando comprovados os requisitos exigidos.

No processo de avaliação, de acordo com a RDC nº36 (Resolução da Diretoria Colegiada) de 25 de julho de 2013, a ANVISA avalia questões de segurança, usabilidade, riscos à saúde, características dos produtos, os testes realizados, além de outras informações que sejam pertinentes. Todos esses dados compõem um único documento, o arquivo mestre, também conhecido como *master file*. Para a compor esse documento, a ANVISA estabelece que os produtos sejam enquadrados em classes de risco, que podem ser de grau I, II, III ou IV, sendo o grau I o que apresenta o menor risco e o grau IV, o que apresenta maior risco à saúde. Quanto maior o grau de risco de um determinado produto, maiores são os requisitos necessários para comprovar sua qualidade e segurança no arquivo mestre.

De acordo com Albino (2018), baseada na lei de Arrhenius, o estudo de estabilidade acelerada é aplicado em produtos quantitativos, sem a necessidade de ter conhecimento prévio da complexidade das reações químicas que compõem o produto. A partir do comportamento da característica funcional com o tempo, é possível estimar, a priori, os valores das constantes cinéticas ( $k$ ) do complexo reacional, aplicando o método de análise integral e o método da função objetivo juntamente com a dispersão de dados. A posteriori, com os valores das constantes cinéticas ( $k$ ) e as correspondentes temperaturas, é possível

determinar a energia de ativação ( $E_{atv}$ ) do complexo reacional, por meio da Equação de Arrhenius.

Para os produtos em que a análise seja qualitativa ou semiquantitativa, o estudo de estabilidade acelerada é realizado a partir do fator de aceleração  $\alpha_{10}$ , predeterminado pela ANVISA, que parte do pressuposto de que a velocidade de uma reação tem seu valor dobrado, quando o complexo reacional é submetido a um aumento de  $10,0^{\circ}\text{C}$  na temperatura.

Segundo LABUZA (1982), essa consideração parte da hipótese de que a energia de ativação da grande maioria das reações que compõem os produtos da indústria alimentícia e farmacêutica são caracterizados por valores entre 41 e 54 kJ/mol, dando origem ao  $\alpha_{10}$  igual a 2,0. Para o estudo de estabilidade do teste de Chagas, o valor da energia de ativação obtido foi de 48,60 kJ/mol e o  $\alpha_{10}$  igual a 2,08, valores bem próximos do intervalo estabelecido pela ANVISA.

## **1.1 Objetivos**

O estudo de estabilidade acelerada, aplicado ao teste para detecção da doença de Chagas, tem como objetivos: comprovar a funcionalidade do produto em um intervalo de tempo menor, simulando a sua data de validade; determinar a energia de ativação ( $E_{atv}$ ) do complexo reacional do teste, bem como o fator de aceleração  $\alpha$ , de forma mais robusta, por meio do tratamento de dados experimentais, utilizando dois métodos distintos para determinação de parâmetros cinéticos, sendo eles o método integral e da função objetivo e, por fim, compará-los com os valores definidos pela ANVISA.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Análise do Tempo de Vida de Prateleira**

O estudo de estabilidade acelerada, realizado para avaliar a data de validade ou o tempo de vida de prateleira, pode ser aplicado a uma gama diversa de produtos, exigindo, no entanto, planejamento, para que as temperaturas de aceleração possam ser escolhidas sem alterar bruscamente a parte primária do produto, que se refere à característica que será avaliada com o tempo e as características secundárias, que correspondem às outras partes do produto que indiretamente impactam na análise da característica primária.

Um dos estudos realizados para avaliar o *shelf-life* remete à aplicação da estabilidade acelerada para comparar a concentração de xampus comerciais e manipulado, contendo cetoconazol. Nesse estudo, as amostras foram submetidas a estresse térmico entre as temperaturas de 40,0°C e 80,0°C, sendo variadas de 10,0 em 10,0°C, durante 30 minutos diários, em 15 ciclos de aquecimento e resfriamento, sendo cada ciclo realizado em um dia. No último ciclo, o xampu manipulado manteve em torno de 60,0% das características originais, enquanto o comercial manteve 47,0%, o que representa uma perda considerável do seu potencial de ação, dentro do prazo de validade registrado do produto (BOAROLLI e BENDER, 2019).

Em cosméticos, em que o princípio ativo é a vitamina C, o estudo de estabilidade acelerada pode ser aplicado para mensurar a temperatura de armazenamento do produto. De acordo com os estudos de AQUINO e FELIPE, 2014, foram testados três tipos de géis com a mesma concentração de vitamina C em duas diferentes bisnagas, sendo elas de alumínio e de plástico, submetidas às temperaturas de 5,0°C, ambiente e 40°C, por um intervalo de tempo de 0,30,60 e 90 dias. Analisando o teor de vitamina C no final dos 90 dias, que corresponde à data de validade do produto, concluiu-se que a bisnaga de alumínio armazenada em 5,0°C mantinha o maior teor de vitamina C.

Em estudo mais recente, foi realizado o estudo de estabilidade acelerada para avaliar características organolépticas, como aspecto físico, cor e odor, além da densidade e análise de pH de um xarope fitoterápico, por uma empresa de Santos, no litoral de São Paulo, que foi desenvolvido com a utilização de 6 tipos diferentes de plantas medicinais. O estudo foi realizado por um período de 3 meses, em intervalos regulares, mantendo condições de temperatura e umidade próximas de 50,0°C e UR (Umidade Relativa) de 90,0%. Após o período de 30 meses, o estudo mostrou que o pH teve uma alteração muito alta, gerando características organolépticas, como odor desagradável, além de aumentar sua viscosidade, o que indicou ser necessário novos estudos, a fim de melhorar a eficácia e segurança do medicamento (GUIDI e MELLO, 2020).

## 2.2 Cinética Química

De acordo com COSTA (2018), a termodinâmica é definida como uma ciência experimental que estuda as mudanças de estado das substâncias puras e misturas, a partir de alterações em variáveis como temperatura, pressão e estados de agregação. Embora grande

parte dos problemas que envolvam a termodinâmica estejam relacionados com as mudanças de estado da matéria, provocadas pela transferência de calor ou pela realização de trabalho, os cálculos termodinâmicos não permitem determinar o quão rápido se estabelecem os estados finais de equilíbrio das reações, sendo indispensável a aplicação da cinética química.

Uma das grandezas mais importantes da termodinâmica foi determinada pelo físico, matemático e químico norte-americano Josiah Willard Gibbs, em 1883, como citado por CORREIA (2020). A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), como é conhecida, prevê a espontaneidade das reações químicas e está associada a grandezas como entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) do sistema, de acordo com a Equação 2.1:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2.1)$$

Uma reação química espontânea tende a ocorrer sem a adição de energia externa ao sistema, podendo ser rápida ou lenta, já que a espontaneidade não é um fator dependente da cinética. Por outro lado, as reações não espontâneas necessitam de energia externa para se processar. As baterias de celulares e automóveis são exemplos característicos de sistemas que necessitam de energia elétrica externa, para que as reações eletrolíticas se processem. Por outro lado, as pilhas alcalinas são classificadas como espontâneas, pois a energia potencial reacional é capaz de fornecer um excedente de energia suficiente para o próprio sistema, não sendo necessária a fonte externa de energia.

Do ponto de vista termodinâmico para que uma reação química seja classificada como espontânea, o valor da energia livre de Gibbs deve ser negativo ( $\Delta G < 0$ ). Em contrapartida, para reações não espontâneas, a energia livre de Gibbs assume um valor positivo ( $\Delta G > 0$ ).

De acordo com PEDRO (2009), nos sistemas em que a reação é exotérmica ( $\Delta H < 0$ ) e ao mesmo tempo a variação de entropia é positiva ( $\Delta S > 0$ ), tem-se um balanço de energia livre de Gibbs negativa, de acordo com a Equação 2.1, e o sistema é classificado como espontâneo. Por outro lado, em sistemas em que a reação é endotérmica ( $\Delta H > 0$ ) e ao mesmo tempo possui uma variação de entropia negativa ( $\Delta S < 0$ ), a energia livre de Gibbs tem um balanço positivo e, portanto o sistema é classificado como não espontâneo.

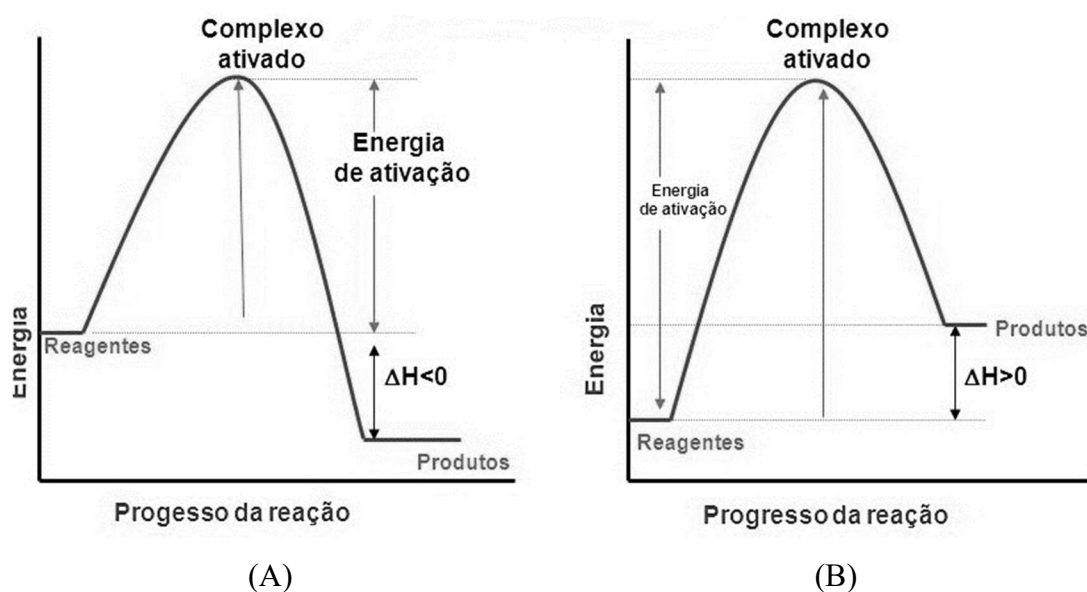
Nos casos em que a reação é exotérmica e a variação de entropia é negativa, bem como nos casos em que a reação é endotérmica e a variação de entropia é positiva, o valor da energia livre de Gibbs, dependerá da temperatura do sistema. No primeiro caso, se o termo  $\Delta H$  da reação exotérmica for maior do que o termo  $-T \cdot \Delta S$  com entropia negativa, a reação

será espontânea, já no segundo caso, para que a reação seja considerada espontânea o termo  $-T.\Delta S$ , com entropia positiva deve ser maior em relação à variação de entalpia ( $\Delta H$ ), para reação endotérmica.

Conforme SILVA (2017), enquanto a termodinâmica é capaz de prever se uma reação é ou não espontânea, através dos estados inicial e final do sistema, a cinética química permite determinar a velocidade com que o sistema alcançará o seu estado de equilíbrio e quais são os fatores que podem influenciar nos aspectos dinâmicos da reação, como, por exemplo, as colisões entre as partículas.

Segundo PEDRO (2009), na teoria das colisões, os reagentes em uma determinada reação química, não são instantaneamente convertidos em produtos, mesmo nas reações que, relativamente, se processam muito rapidamente. O contato efetivo entre as moléculas depende da orientação das colisões, que por sua vez depende do grau de agitação das partículas. Quanto maior o grau de agitação das moléculas, maior é a probabilidade de ocorrerem colisões efetivas, que proporcionam o aumento da energia cinética do sistema a ponto de superar a “barreira” energética denominada energia de ativação ( $E_{atv}$ ), que é definida como a energia mínima necessária que o sistema deve adquirir para que a reação se processe. A Figura 2.1 apresenta o diagrama de energia de ativação genérico, de uma reação exotérmica (A) e endotérmica (B), respectivamente.

**Figura 2.1: Diagrama de energia de ativação pictórico de uma reação exotérmica (A) e endotérmica (B)**



Ao atingir a energia de ativação, há a formação do complexo ativado, caracterizado como um estado intermediário, em que as ligações químicas dos reagentes estão sendo enfraquecidas e as ligações dos produtos estão sendo formadas. Superada a energia de ativação há a formação dos produtos, que podem ter valor de entalpia menor em relação aos reagentes ( $\Delta H < 0$ ), como apresentado na Figura 2.1 (A), sendo, portanto classificada como uma reação exotérmica, ou ter valor de entalpia maior em relação aos reagentes ( $\Delta H > 0$ ), como apresentado na Figura 2.1 (B), e a reação é classificada como endotérmica.

De acordo com Silva (2008), embora a colisão efetiva seja um dos fatores primordiais para a ocorrência de uma reação química ou de um complexo reacional, uma gama gigantesca de reações levaria um tempo relativamente muito grande para se processar em seu estado natural. Para contornar esse processo moroso é comumente utilizado um catalisador químico, que corresponde a uma substância química capaz de aumentar a velocidade reacional, sem, contudo, participar efetivamente da reação. Em outras palavras, o catalisador é a substância responsável por induzir o contato efetivo entre os reagentes, permitindo alcançar a energia de ativação com uma maior velocidade.

A temperatura é uma outra variável que aumenta a probabilidade de contato efetivo entre as partículas dos reagentes, favorecendo o aumento da velocidade reacional. Quanto maior a temperatura, maior a energia cinética das moléculas, conseqüentemente, maior a proporção de colisões efetivas entre as partículas e, portanto, mais rapidamente ocorre a formação dos produtos.

### 2.3 Leis de Velocidade

Conforme PEDRO (2009) para uma reação química genérica, sendo processada em um sistema fechado, onde não há troca de matéria com o meio externo, a lei de velocidade pode ser representada pela Equação (2.2).

$$v = \frac{1}{\nu_i} \frac{dC_i}{dt} \quad (2.2)$$

em que  $v$  é a velocidade da reação,  $\nu_i$  o coeficiente estequiométrico da espécie  $i$ , sendo negativo para os reagentes e positivo para os produtos e  $dC_i/dt$  a variação infinitesimal da

concentração da espécie  $i$  em função do tempo de reação.

Para exemplificar, a velocidade da reação genérica:



será, de acordo com a Equação 2.2, expressa por:

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = -\frac{1}{3} \frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{2} \frac{dC_C}{dt} \quad (2.3)$$

De acordo com a Equação 2.3, a taxa de consumo do reagente A é três vezes maior do que a taxa de consumo do reagente B, porque três moléculas desse último precisam reagir com uma molécula de A para formar C.

Ainda, conforme PEDRO (2009), matematicamente, a partir de variáveis como temperatura e pressão constantes do sistema, a relação que descreve a forma de como a velocidade de uma reação química varia em função da concentração das espécies do sistema está de acordo com a Equação 2.4, que representa a lei de velocidade da reação.

$$v = -\frac{dC_i}{dt} = k \cdot \prod_{i=1}^x C_i^n \quad (2.4)$$

em que  $k$  é a constante de velocidade ou constante cinética e o termo  $\prod_{i=1}^x C_i^n$  é o produto das concentrações das espécies de reagentes  $i$ , com ordem cinética  $n$ . Para uma reação dita elementar,  $n$  corresponde ao coeficiente estequiométrico da espécie  $i$ . Por exemplo, a lei de velocidade para a reação genérica elementar, com a espécie A como reagente limitante:

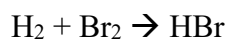


será, de acordo com a Equação 2.5, dada por:

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = k \cdot [C_A]^1 \cdot [C_B]^2 \quad (2.5)$$

Nesse caso, tem-se ordem 1 para o reagente A e ordem 2 para a reagente B, resultando em uma 3ª ordem global.

Segundo ALBINO (2018), para reações não elementares, as leis de velocidade têm formatos diferentes da Equação 2.4, sendo que suas leis são determinadas empiricamente. Para o exemplo a seguir, determinou-se experimentalmente que a reação em estado gasoso:



é dada pela Equação 2.6, de velocidade complexa:

$$v = \frac{k_1 \cdot [\text{H}_2] \cdot [\text{Br}_2]^{\frac{1}{2}}}{1 + k_2 \cdot [\text{HBr}] \cdot [\text{Br}_2]} \quad (2.6)$$

É possível notar que, nesse caso a lei de velocidade não segue uma ordem definida, de acordo com a lei elementar.

## 2.4 Estabilidade Acelerada

Segundo a legislação brasileira, baseada na RDC nº259 de 20 de setembro de 2002, para conhecimento do consumidor, todo produto industrializado deve apresentar algumas informações em seus rótulos, como lista dos ingredientes, identificação da origem, do lote e a data de validade. Essa última em específico, também conhecida como tempo de vida de prateleira, ou do inglês *shelf-life*, deve ser analisada por meio de quatro tipos de estudos diferentes quando pertinentes, independentemente do grau de risco em que se enquadra o produto. São eles: o estudo de validade em tempo real, de validade após a primeira abertura, estudo de estabilidade em transporte e o estudo de estabilidade acelerada, todos realizados simultaneamente.

No estudo de estabilidade em tempo real, o produto é testado ao longo da data de validade em períodos regulares. Por exemplo, se o referido produto possui um ano de validade, ele deve ser testado no mínimo mês a mês, a fim de avaliar sua funcionalidade de acordo com os padrões da ANVISA. Dessa forma, a cada mês um novo produto do mesmo lote é aberto e testado. Por sua vez, o estudo de estabilidade após a primeira abertura segue o mesmo procedimento do estudo em tempo real, todavia os testes são realizados nos

produtos que foram abertos desde a primeira testagem, o que permite avaliar, por quanto tempo ele mantém suas características quando submetido ao contato externo, desde que após o uso o produto retorne para suas devidas condições de armazenamento, devidamente identificadas no rótulo e na instrução de uso.

No terceiro estudo, a estabilidade em transporte é simulada, de acordo com as localidades em que esses produtos são destinados após a venda. Eles são submetidos a variações de temperaturas em estufas e câmaras frias, para simular as diferentes temperaturas das diversas regiões do país. São também colocados em automóveis que circulam em estradas nas mais diversas condições, simulando o atrito do produto com sua embalagem e com as caixas de transporte. No caso de produtos refrigerados, esse estudo ainda permite identificar a quantidade de “gelo” que deve ser colocado no interior da caixa de transporte (isopor), a fim de que o produto chegue até o cliente nas condições específicas de temperatura.

No quarto e último estudo, mas não menos importante, a ANVISA exige o estudo de estabilidade acelerada, em que o produto é submetido à sua temperatura de armazenamento e em diferentes temperaturas mais elevadas, denominadas temperaturas de aceleração. Nesse estudo, o *stress* térmico aumenta a velocidade de decomposição do produto, permitindo simular sua data de validade em um período menor, obtendo informações adiantadas sobre sua funcionalidade. Nos casos em que o estudo não se enquadra, o estudo em tempo real é considerado para o registro em ANVISA.

De acordo com ALBINO (2018), para o estudo de estabilidade acelerada, a lei de velocidade elementar está atrelada à degradação química do produto, por meio da temperatura, provocando o que se denomina de “*stress térmico*”. Conforme um determinado produto é submetido a aumentos de temperatura superiores à sua temperatura de armazenamento, a energia cinética das partículas aumenta e, portanto, a velocidade de degradação desse produto aumenta proporcionalmente.

Para uma característica quantitativa P do produto, aferida em função do tempo, a lei de velocidade de degradação do produto está de acordo com a Equação 2.7, considerando uma reação elementar.

$$v = -\frac{dP_A}{dt} = k \cdot [P_A]^n \quad (2.7)$$

Em concordância com PEDRO (2009), ao se comparar a velocidade de degradação do

produto na temperatura de armazenamento, também denominada de temperatura de mercado ( $T_M$ ) com a velocidade de degradação na temperatura acelerada ( $T_A$ ), para uma mesma ordem cinética da característica P, o fator de aceleração ( $\alpha$ ), dado pela razão entre essas duas velocidades, pode ser definida de acordo com a Equação 2.8:

$$\alpha = \frac{v_{TA}}{v_{TM}} = \frac{k_{TA}}{k_{TM}} \cdot \frac{[P_A]^n}{[P_A]^n} \quad (2.8)$$

em que  $v_{TA}$  e  $v_{TM}$ , são as velocidades nas temperaturas de aceleração e de mercado, respectivamente;  $k_{TA}$  e  $k_{TM}$ , correspondem aos valores das constantes cinéticas nas temperaturas de aceleração e de mercado e  $P_A$  a característica funcional do produto, analisada em um tempo “t”. Para o teste para detecção de Chagas, por exemplo, a característica  $P_A$  é a densidade óptica.

Uma particularidade da Equação 2.8, muito utilizada pela ANVISA é o fator de aceleração  $\alpha_{10}$ , que representa a razão entre as velocidades reacional, para uma temperatura de aceleração de 10,0°C maior em relação à temperatura de armazenamento do produto, de acordo com a Equação 2.9.

$$\alpha_{10} = \frac{v_{TA}}{v_{TM}} = \frac{k_{TA}}{k_{TM}} \quad (2.9)$$

A grande vantagem de se utilizar o fator de aceleração  $\alpha$ , considerando a mesma ordem cinética para o complexo reacional, é que seu valor se torna dependente apenas das constantes de velocidade, como evidenciado pela Equação 2.9, mantendo-se a ordem de grandeza entre o numerador e o denominador.

Matematicamente, a Equação de Arrhenius relaciona os valores das constantes cinéticas com a temperatura absoluta, de acordo com a Equação 2.10:

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_{atv}}{R \cdot T}} \quad (2.10)$$

em que  $k_0$  é denominado fator de frequência,  $E_{atv}$  a energia de ativação do complexo reacional, R a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta, na qual o produto é submetido.

Ao substituir os termos de  $k_{TA}$  e  $k_{TM}$ , da Equação 2.9, pela Equação 2.10, e considerando o valor da constante dos gases ideais R igual a 1,986 cal/mol.k, o fator de

aceleração  $\alpha_{10}$ , pode ser expresso de acordo com a Equação 2.11:

$$\alpha_{10} = 10^{\frac{2,19.E_a}{T_M.(T_M+10)}} \quad (2.11)$$

A partir do fator de aceleração  $\alpha_{10}$  é possível determinar o fator  $Q_{10}$ , de acordo com a Equação 2.12, que relaciona a diferença entre as temperaturas de armazenamento e de aceleração.

$$Q_{10} = \alpha_{10}^{\frac{(T_A - T_M)}{10}} \quad (2.12)$$

Por meio do fator  $Q_{10}$  é possível estimar quantos dias o produto deve ser submetido à temperatura de aceleração para simular sua data de validade, conforme a Equação 2.13

$$t = \frac{DT}{Q} \quad (2.13)$$

em que “t” é o tempo, em dias, em que o produto será submetido à temperatura de aceleração  $T_A$  e  $DT$  é a data de validade do produto em dias. Para temperaturas de aceleração superiores a  $10,0^\circ\text{C}$ , o fator  $Q$  obedece a mesma relação da Equação 2.12.

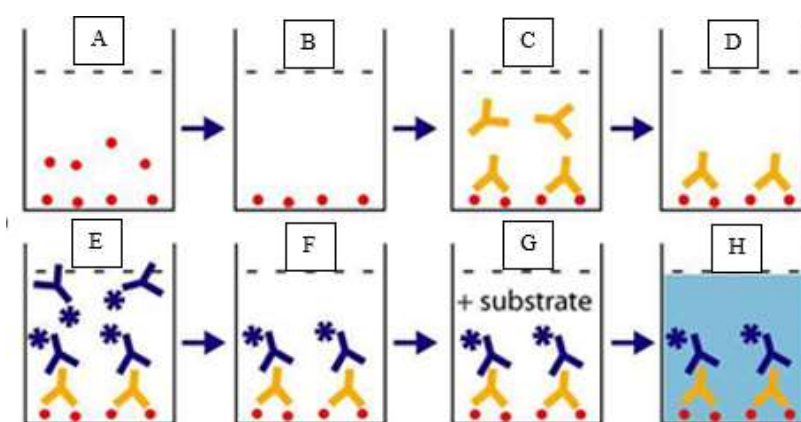
Para produtos qualitativos ou semiquantitativos, a ANVISA estabelece que para o estudo de estabilidade acelerada deve-se considerar o fator de aceleração  $\alpha_{10}$  igual a 2,0. A partir desse valor, determina-se o fator  $Q_{10}$  e, por fim, estima-se pelo valor de “t”, em dias, em que o produto deve ficar exposto na temperatura  $T_A$ , para simular a sua data de validade  $DT$ .

É importante ressaltar que, dependendo da temperatura de armazenamento, uma variação de  $10,0^\circ\text{C}$  não terá tanto efeito sobre o valor da constante cinética e simular a data de validade através da condição acelerada não a torna tão diferente em realizar o estudo de degradação em tempo real. Dessa forma, em diversos casos é mais vantajoso submeter o produto a condições de maior temperatura, aumentando  $20,0^\circ\text{C}$  e até  $30,0^\circ\text{C}$ . Para isso é importante conhecer a sensibilidade térmica do produto, já que outras partes que o compõe podem sofrer danos irreversíveis e impedir que o estudo seja realizado com eficiência.

## 2.5 Técnica ELISA para Teste de Chagas

Segundo LIMA et al (2010), a técnica de ELISA (*enzymelinked immunosorbent assay*) é um ensaio imuno-enzimático, utilizada para a detecção de inúmeras doenças, uma delas a de Chagas. Baseado na ligação específica entre antígeno e anticorpo, as 96 cavidades das microplacas do teste são impregnadas com proteínas totais purificadas do *Trypanossoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, como mostrado em (A) e (B) da Figura 2.2

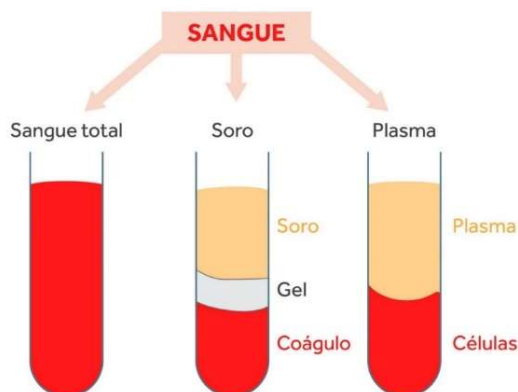
**Figura 2.2: Ilustração da sequência reacional entre antígeno – anticorpo – substrato no interior das cavidades das microplacas.**



Fonte: Almeida e Santiliano

Amostras de sangue dos pacientes são coletadas e centrifugadas para separar a parte mais densa, contendo células vermelhas (eritrócitos), da parte menos densa, denominada de plasma. Essa parte, mais líquida contém o que denominamos de fatores de coagulação, como plaquetas e fibrinogênio, que são importantes para teste de coagulação dos pacientes. Por outro lado, nos testes laboratoriais são comumente utilizadas amostras de soro, que se diferencia do plasma pela ausência dos fatores de coagulação, sendo a parte mais “límpida” e livre de interferentes e são separadas da parte mais densa (coágulo), por um gel presente no tubo de coleta da amostra. A Figura 2.3 evidencia as principais diferenças entre as amostras de sangue total, soro e plasma.

**Figura 2.3 Diferenças entre sangue total, soro e plasma**



Fonte: KASVI

As amostras de soro coletadas são colocadas nas cavidades da microplaca. Em caso positivo para doença de Chagas, o paciente conterà, em sua amostra de soro, proteínas produzidas pelo seu sistema imunológico. Essas proteínas específicas se ligam às proteínas do antígeno *Trypanossoma cruzi*, como demonstrado em (C), da Figura 2.2. Outras proteínas, embora não específicas podem permanecer ligadas ao antígeno e, portanto, gerar valores errôneos durante a leitura no equipamento. Para que esses ligantes sejam eliminados, é adicionado às cavidades da microplaca o tampão de lavagem, que promoverá um “arraste” desses ligantes inespecíficos, restando apenas as proteínas específicas, como evidenciado em (D), da Figura 2.2.

Após a eliminação de interferentes, é adicionado um substrato específico ligado a um cromógeno, substância que produz cor conforme a reação é processada, como mostrado em (E), da Figura 2.2. Como o substrato é específico para as proteínas humanas, ele não se ligará as proteínas do antígeno. Portanto, se o paciente não teve contato com o agente etiológico da doença de Chagas (negativo), ele não terá as proteínas específicas que se ligam ao antígeno e consequentemente, o substrato não permanecerá nas cavidades, apresentando o valor de densidade óptica abaixo de 20,0%.

Após a adição do substrato contendo cromógeno, é adicionado novamente o tampão de lavagem para a retirada do excesso de substrato, como evidenciado em (F), da Figura 2.2. Novamente é adicionado o substrato, como mostrado em (G), da Figura 2.2, para garantir que todas as proteínas presentes foram “marcadas” com o substrato contendo cromógeno.

Por fim, às cavidades é adicionada a solução *stop* ou de parada, para cessar a reação de decomposição que é desencadeada quando o substrato se liga às proteínas da amostra de soro, como mostrado em (H), da Figura 2.2. A microplaca é então colocada no equipamento

para a leitura de densidade óptica das 96 cavidades.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Para a realização do estudo de estabilidade acelerada, diversas microplacas contendo 96 cavidades, como demonstrado na Figura 3.1, foram distribuídas nas temperaturas de 5,0°C e 15,0°C em câmaras fria, na temperatura ambiente de 25,0°C e na temperatura de 35,0°C, em estufa. Cada uma das cavidades da microplaca estava impregnada com proteínas altamente purificadas do *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas.

**Figura 3.1: Microplacas com 96 cavidades impregnadas com proteínas purificadas do *Trypanossoma cruzi*.**



Fonte: Elaboração própria

Ao serem retiradas dos respectivos ambientes de exposição, as cavidades das microplacas foram testadas com soluções controle, certificadas e provenientes do próprio fabricante do aparelho. Nas soluções controle, os valores de densidade óptica eram de 100%, correspondendo a amostras altamente positivas para doença de Chagas. Amostras reais de pacientes não foram utilizadas para testagem, no estudo de estabilidade acelerada, devido à facilidade de degradação das amostras, o que seria uma variável interferente na avaliação da

degradação das microplacas. Dessa forma, a utilização da solução controle permite que a única variável no processo seja a degradação do próprio teste.

### 3.2 Equipamento

Para a leitura dos testes de Chagas, através da técnica de ELISA, utilizou-se o espectrofotômetro, como apresentado pela Figura 3.2. As microplacas com 96 cavidades, impregnadas com antígenos do *Trypanossoma cruzi* e com anticorpos humanos específicos são colocadas na abertura (A) do aparelho.

**Figura 3.2: Espectrofotômetro para leitura de densidade óptica.**



Fonte: Elaboração própria

As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 630 nm, selecionado a partir do *display* em (B), sendo então visualizadas no visor (C) e impressas em “notas” na abertura (D).

### 3.3 Procedimento Experimental

No estudo de estabilidade acelerada, microplacas do mesmo lote foram distribuídas de acordo com as temperaturas que se deseja realizar o estudo. Todas elas continham em suas

cavidades as proteínas totais do *Trypanosoma cruzi* altamente purificadas. Parte das microplacas foram colocadas em câmaras frias, na temperatura de armazenamento do teste (5,0°C) e na temperatura de aceleração de 15,0°C. Uma outra parte das microplacas foram expostas à temperatura ambiente, próxima dos 25,0°C e uma última parte das microplacas foram colocadas em estufa a uma temperatura de aceleração de 35,0°C.

No mesmo dia em que as placas foram distribuídas nas respectivas temperaturas, parte delas foram testadas com as soluções controle, aferindo os resultados de densidade óptica no espectrofotômetro. Esse é o denominado tempo “t= 0 dias”, o qual está associado aos valores de densidade óptica iniciais ( $P_{A0}$ ).

Após 12 dias, o chamado “t= 12 dias”, novos testes, com a solução controle, foram realizados nas placas retiradas das câmaras frias, temperatura ambiente e estufa de 35,0°C, realizando novas leituras de densidade óptica ( $P_A$ ). Na sequência, sucessivos testes foram realizados até que fosse percebida uma queda na leitura de densidade óptica ( $P_A$ ), capaz de representar uma perda significativa da eficiência do teste em função do tempo. Para a temperatura de 5,0°C foram necessários em torno de 404 dias. Para a temperatura de 15°C foram necessários 265 dias, à 25,0°C, 200 dias e, por fim, para a temperatura de 35,0°C um total de 30 dias.

Para cada testagem, a solução controle era distribuída nas 96 cavidades e com os valores de densidade óptica obtidos era realizado uma média dos valores. As medidas de densidade óptica foram lidas em comprimento de onda de 630 nm para detecção dos anticorpos ligados aos antígenos.

Para realização do teste pela técnica de ELISA, inicialmente pipetou-se 120µL da solução diluente de amostra em cada cavidade da placa. Distribuiu-se, então 5µL da amostra de soro de pacientes positivos nas cavidades, utilizando o agitador por alguns segundos para homogeneizar.

Posteriormente cobriu-se as placas com folhas adesivas por um período de 30 minutos para a incubação. Decorridos os 30 minutos, lavou-se as placas com aproximadamente 350 µL do tampão de lavagem diluído, realizando o procedimento de lavagem por pelo menos 5 vezes.

Após a secagem das placas foi adicionado 120 µL da solução de substrato contendo cromógeno, agitando novamente para homogeneizar. Posteriormente, as cavidades foram lavadas novamente, por pelo menos 3 vezes.

Por fim, após a secagem, adicionou-se 50 µL da solução *stop*, para cessar o processo

reacional e, então as placas foram colocadas no espectrofotômetro para as leituras de densidade óptica.

### 3.4 Procedimento de Cálculos

#### 3.4.1 Método Integral para determinação de Parâmetros cinéticos

De acordo com PEREIRA, 2016, para realização do tratamento de dados, a partir do método integral, deve-se relacionar os dados de densidade óptica ( $P_A$ ), obtidos com o tempo, por meio das seguintes etapas:

- A partir do sistema isotérmico, supõe-se um modelo cinético elementar para determinar a equação ou lei de velocidade na forma diferencial;
- Com a integração, consideradas as devidas condições de contorno, determina-se a equação linearizada para a ordem cinética considerada, como exemplificado no Quadro 3.1;
- Uma vez realizada a integração, obtém-se equações lineares, que a partir dos dados experimentais coletados é possível fazer a representação gráfica do modelo cinético hipotético;
- Para cada ordem cinética hipotética a equação varia e, portanto, os termos dos eixos das abcissas e ordenadas variam na representação gráfica;
- Se os resultados experimentais coletados se ajustarem à ordem hipotética, através da análise do coeficiente de determinação múltiplo ( $R^2$ ), conclui-se que a ordem sugerida é admitida como correta;
- Se, por outro lado, os dados experimentais não se ajustam a uma reta, de acordo o modelo cinético proposto, então a ordem cinética hipotética é rejeitada.

É importante ressaltar que, o método de análise integral é aplicado na determinação de parâmetros cinéticos e, portanto, deve ser utilizado com uma alternativa e não como um método único, já que desconsidera grande parte dos erros de aproximação entre a lei teórica suposta e os valores experimentais. Dessa forma, é indispensável aplicar um método comparativo para avaliar o distanciamento entre a lei teórica suposta como verdadeira e os dados do experimento, como, por exemplo, o método de dispersão de dados.

**Quadro 3.1: Relação entre as equações lineares e as ordens cinéticas**

Ordem Cinética	Equação Linearizada	Parâmetros
n = 0	$P_A - P_{A0} = -k.t$	Coeficiente angular = -k Coeficiente linear = $P_{A0}$
n = 1	$\ln[P_A] - \ln[P_{A0}] = -k.t$	Coeficiente angular = -k Coeficiente linear = $\ln [P_{A0}]$
n = 2	$\frac{1}{P_{A0}} - \frac{1}{P_A} = -k.t$	Coeficiente angular = -k Coeficiente linear = $\frac{1}{P_{A0}}$
n = 3	$\frac{1}{2.P_{A0}^2} - \frac{1}{2.P_A^2} = -k.t$	Coeficiente angular = -k Coeficiente linear = $\frac{1}{2.P_{A0}^2}$
n = 4	$\frac{1}{3.P_{A0}^3} - \frac{1}{3.P_A^3} = -k.t$	Coeficiente angular = -k Coeficiente linear = $\frac{1}{3.P_{A0}^3}$

Fonte: Elaboração própria

De acordo com as etapas do método integral, considerando um complexo reacional genérico de ordem n, a Equação 2.4 pode ser reescrita de acordo com a Equação 3.1:

$$-\frac{dP_A}{dt} = k. [P_A]^n \quad (3.1)$$

em que  $P_A$  é a densidade óptica do teste, medida em relação ao tempo, em dias e n a ordem cinética do complexo reacional.

Separando as variáveis de densidade óptica e de tempo, obtém-se a Equação 3.2:

$$-\frac{dP_A}{[P_A]^n} = k. dt \quad (3.2)$$

Integrando ambos os membros da Equação 3.2, obtém-se as equações 3.3 e 3.4, de acordo com as seguintes condições de contorno:

- $t = 0$  dias,  $P = P_{A0}$
- $t = \infty$  dias,  $P = P_A$

$$- \int_{P_{A0}}^{P_A} \frac{dP_A}{[P_A]^n} = k \cdot \int_0^t dt \quad (3.3)$$

$$\frac{1}{P_A^{n-1}} - \frac{1}{P_{A0}^{n-1}} = (n - 1) \cdot k \cdot t \quad (3.4)$$

### 3.4.2 Método da Função Objetivo e Dispersão de Dados

A Função Objetivo (S) é uma análise baseada no método dos mínimos quadrados, útil para determinar os valores dos parâmetros cinéticos da lei de velocidade, como a constante cinética (k), a partir de uma série de medidas.

Pode-se dizer que a função objetivo consiste em minimizar, para cada parâmetro cinético, a diferença entre os dados experimentais e um modelo cinético proposto. Dessa forma, faz-se a derivada da Função Objetivo (S) em relação a cada parâmetro, igualando-a a zero, resultando num sistema de equações lineares para encontrar os melhores valores da constante cinética (k).

A Equação 3.5 expressa a função objetivo, dada pelo quadrado da diferença entre o modelo cinético proposto ( $\hat{y}$ ) e os dados experimentais ( $y_{exp}$ ):

$$S = \sum_{i=0}^n (\hat{y} - y_{exp})^2 \quad (3.5)$$

De acordo com o método integral, o modelo cinético de terceira ordem foi o que mais se aproximou dos dados experimentais, visto que foi o modelo com o maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A Equação 3.6 representa o modelo cinético de terceira ordem, de acordo com o Quadro 5.1.

$$\frac{1}{2 \cdot P_{A0}^2} - \frac{1}{2 \cdot P_A^2} = -k \cdot t \quad (3.6)$$

Como o modelo cinético ( $\hat{y}$ ) parte de uma ordem proposta para o complexo reacional, a constante cinética torna-se a variável única a ser determinada. Dessa forma, para um único parâmetro cinético a ser determinado, o modelo cinético pode ser aproximado por meio da Equação 3.7, que compara a Equação 3.6 com a equação de uma reta.

$$\hat{y} = a_0 \cdot X_0 \quad (3.7)$$

em que  $a_0$  representa a constante cinética (k) a ser determinada e  $X_0$  o tempo considerado para a coleta de dados, no estudo de estabilidade acelerada.

Substituindo a Equação 3.7 na Equação 3.5, a função objetivo pode ser reescrita, de acordo com a Equação 3.8:

$$S = \sum_{i=0}^n (a_0 \cdot X_0 - y_{\text{exp}})^2 \quad (3.8)$$

Derivando a função objetivo em função de  $a_0$ , que representa a constante cinética (k) a ser determinada, pode-se encontrar o mínimo da função objetivo e explicitar o termo  $a_0$ , de acordo com as Equações 3.9 e 3.10.

$$\frac{dS}{da_0} = 2 \cdot \sum_{i=0}^n (a_0 \cdot X_0 - y_{\text{exp}}) \cdot X_0 = 0 \quad (3.9)$$

$$a_0 = \frac{\sum_{i=0}^n y_{\text{exp}} \cdot X_0}{\sum_{i=0}^n X_0^2} \quad (3.10)$$

em que  $y_{\text{exp}} = \frac{1}{2 \cdot P_{A0}^2} - \frac{1}{2 \cdot P_A^2}$  e  $X_0$  o tempo “t” do experimento.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o teste de Chagas ELISA, os dados de densidade óptica ( $P_A$ ), foram relacionados em função do tempo, por meio do método de análise integral e função objetivo. O conjunto de dados das quatro diferentes temperaturas, as quais o teste para detecção da doença de Chagas foi submetido, sendo elas a temperatura de armazenamento à 5,0°C e as temperaturas de aceleração, de 15°C, 25°C e 35°C, foram utilizados considerando a ordens cinéticas de zero, 1ª, 2ª, 3ª e 4ª ordens, identificando, através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), qual das ordens supostas como verdadeiras, mais se aproximou dos dados experimentais. O Quadro 4.1, relaciona os dados experimentais de densidade óptica ( $P_A$ ), em função do tempo às supostas ordens cinéticas, para a condição de armazenamento do teste, a uma temperatura de 5,0°C.

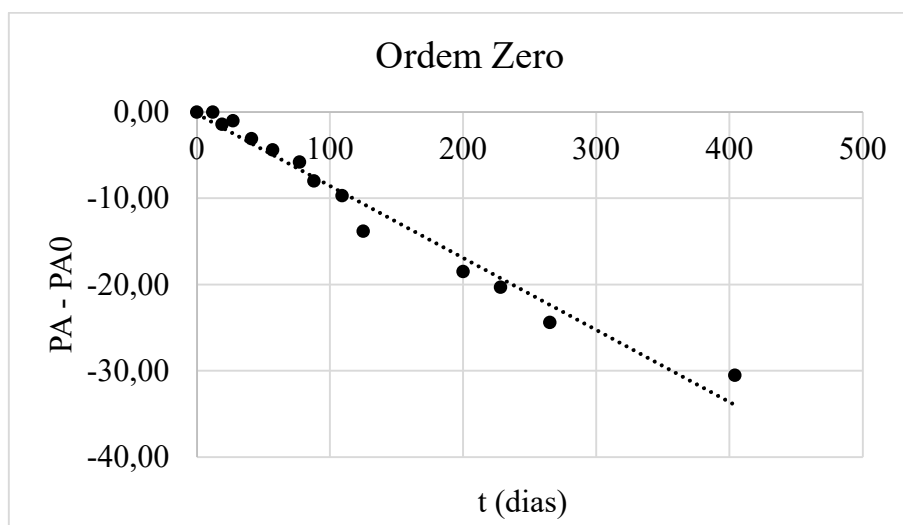
**Quadro 4.1: Dados de densidade óptica em função do tempo, na temperatura de armazenamento de 5,0°C, para o teste de Chagas ELISA.**

Tempo (dias)	Ordens Cinéticas					
	Densidade Óptica (%)	0 $P_A - P_{A0}$	1ª $\ln[P_A/P_{A0}]$	2ª $1/P_{A0} - 1/P_A$	3ª $1/2 \cdot (P_{A0})^2 - 1/2 \cdot (P_A)^2$	4ª $1/3 \cdot (P_{A0})^3 - 1/2 \cdot (P_A)^3$
0	100,00	0,00	0,000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
12	100,00	0,00	0,000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
19	98,60	-1,40	-0,014	-1,42E-04	-1,43E-06	-1,44E-08
27	99,00	-1,00	-0,010	-1,01E-04	-1,02E-06	-1,02E-08
41	96,90	-3,10	-0,031	-3,20E-04	-3,25E-06	-3,30E-08
57	95,60	-4,40	-0,045	-4,60E-04	-4,71E-06	-4,82E-08
77	94,20	-5,80	-0,060	-6,16E-04	-6,35E-06	-6,54E-08
88	92,00	-8,00	-0,083	-8,70E-04	-9,07E-06	-9,47E-08
109	90,30	-9,70	-0,102	-1,07E-03	-1,13E-05	-1,19E-07
125	86,20	-13,80	-0,149	-1,60E-03	-1,73E-05	-1,87E-07
200	81,50	-18,50	-0,205	-2,27E-03	-2,53E-05	-2,82E-07
228	79,70	-20,30	-0,227	-2,55E-03	-2,87E-05	-3,25E-07
265	75,60	-24,40	-0,280	-3,23E-03	-3,75E-05	-4,38E-07
404	69,50	-30,50	-0,364	-4,39E-03	-5,35E-05	-6,60E-07

Fonte: Elaboração própria

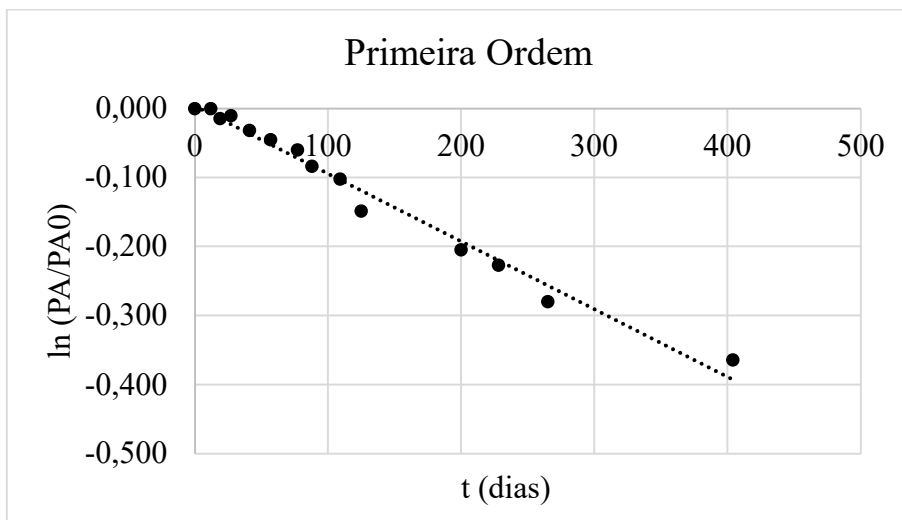
A partir dos dados do Quadro 4.1, plotou-se os gráficos linearizados para cada uma das ordens cinéticas, de acordo com as Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.5 e 4.6.

**Figura 4.1: Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.**



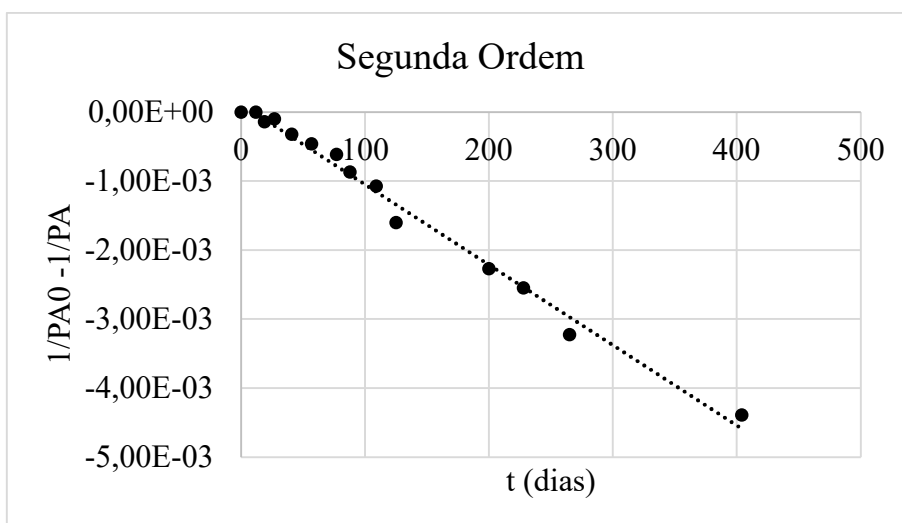
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.2: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.**



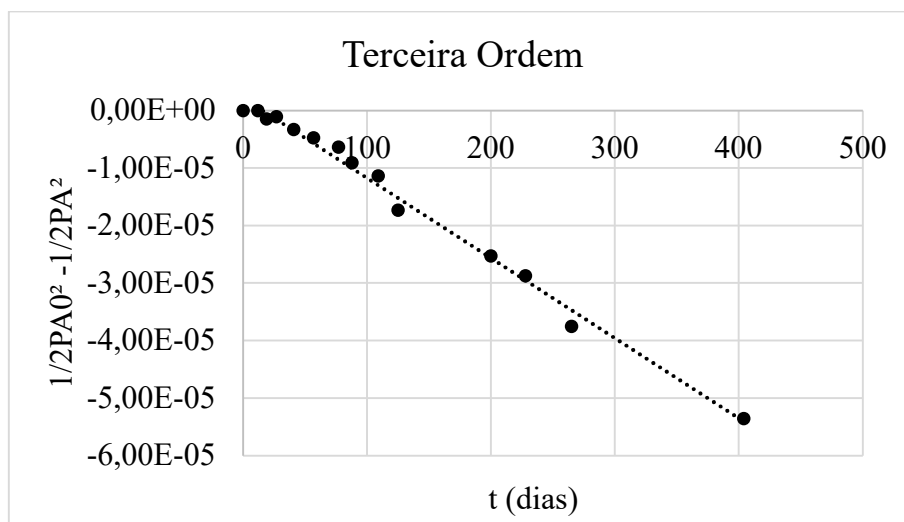
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.3: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.**



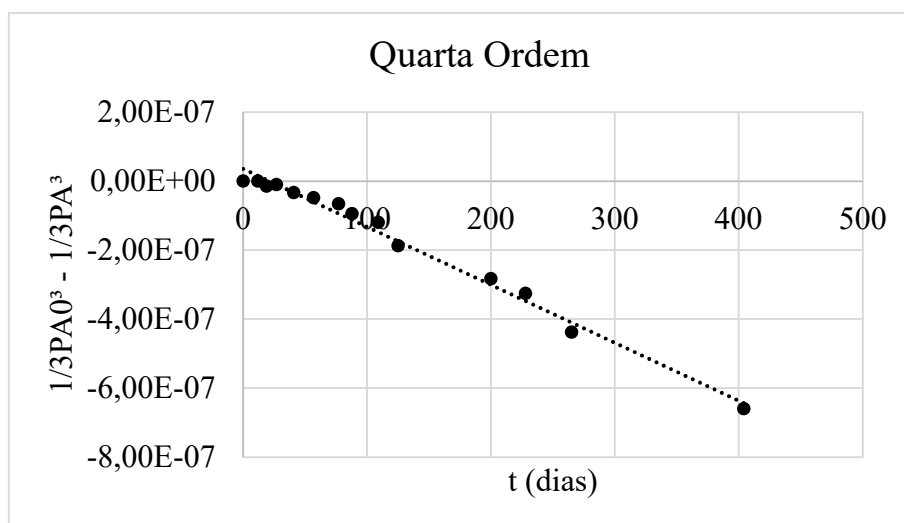
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.4: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.5: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de armazenamento de 5,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

Os valores das constantes de velocidade (k) para cada uma das ordens cinéticas provenientes das equações linearizadas, referente à temperatura de armazenamento de 5,0°C, do teste de Chagas ELISA, bem como dos respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão demonstrados no Quadro 4.2.

**Quadro 4.2 Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação  $R^2$  para temperatura de 5,0°C.**

Ordem cinética	Equação da reta	k [unidade de densidade/tempo]	$R^2$
0	$y = -0,0835x - 0,2076$	$8,35 \cdot 10^{-2}$	0,9724
1	$y = -0,001x + 0,0038$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,9833
2	$y = -1E-05x + 0,0001$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	0,9898
3	$y = -1E-07x + 2E-06$	$1,00 \cdot 10^{-7}$	0,9916
4	$y = -2E-09x + 4E-08$	$2,00 \cdot 10^{-9}$	0,9883

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os dados do Quadro 4.2, observa-se que o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) teve seu valor mais próximo de 1,0, para a 3ª ordem cinética, o que indica que o modelo de terceira ordem mais se aproximou dos dados experimentais, para a temperatura de armazenamento de 5,0°C.

O Quadro 4.3 relaciona os dados experimentais de densidade óptica em função do tempo às supostas ordens cinéticas, para a condição de aceleração, a uma temperatura de 15,0°C do teste de Chagas ELISA.

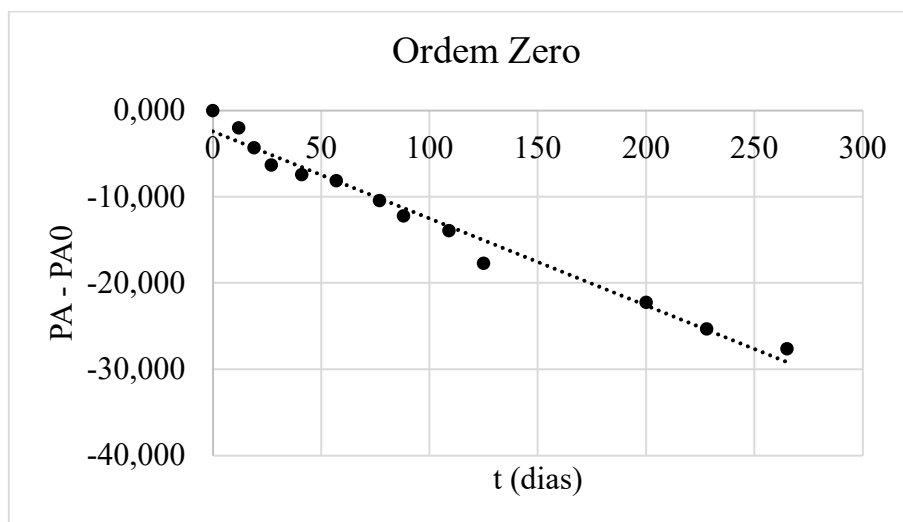
**Quadro 4.3: Dados de densidade óptica em função do tempo, na temperatura de aceleração de 15,0°C, para o teste de Chagas ELISA.**

Tempo (dias)	Ordens Cinéticas					
	Densidade Óptica (%)	0 $P_A - P_{A0}$	1ª $\ln[P_A/P_{A0}]$	2ª $1/P_{A0} - 1/P_A$	3ª $1/2 \cdot (P_{A0})^2 - 1/2 \cdot (P_A)^2$	4ª $1/3 \cdot (P_{A0})^3 - 1/2 \cdot (P_A)^3$
0	100,00	0,00	0,000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
12	98,00	-2,00	-0,020	-2,04E-04	-2,06E-06	-2,08E-08
19	95,70	-4,30	-0,044	-4,49E-04	-4,59E-06	-4,70E-08
27	93,70	-6,30	-0,065	-6,72E-04	-6,95E-06	-7,19E-08
41	92,60	-7,40	-0,077	-7,99E-04	-8,31E-06	-8,65E-08
57	91,90	-8,10	-0,084	-8,81E-04	-9,20E-06	-9,61E-08
77	89,60	-10,40	-0,110	-1,16E-03	-1,23E-05	-1,30E-07
88	87,80	-12,20	-0,130	-1,39E-03	-1,49E-05	-1,59E-07
109	86,10	-13,90	-0,150	-1,61E-03	-1,74E-05	-1,89E-07
125	82,30	-17,70	-0,195	-2,15E-03	-2,38E-05	-2,65E-07
200	77,80	-22,20	-0,251	-2,85E-03	-3,26E-05	-3,75E-07
228	74,70	-25,30	-0,292	-3,39E-03	-3,96E-05	-4,66E-07
265	72,40	-27,60	-0,323	-3,81E-03	-4,54E-05	-5,45E-07

Fonte: Elaboração própria

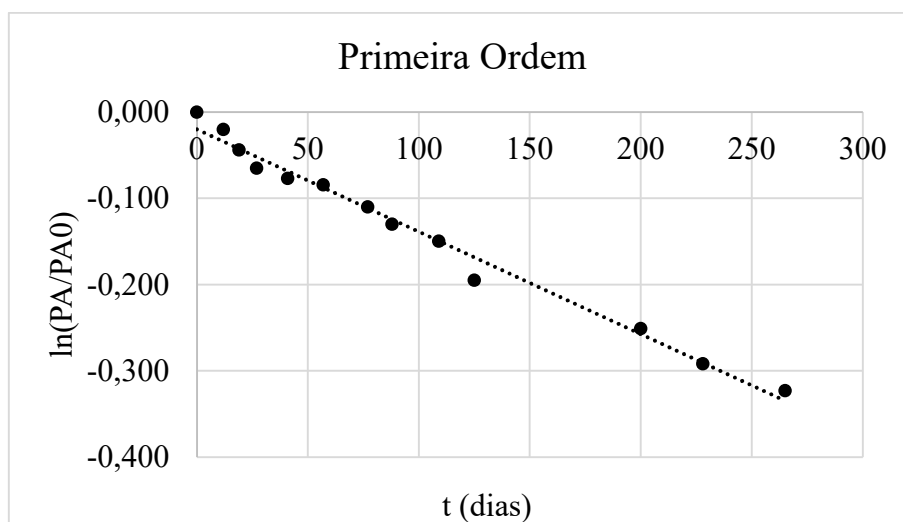
A partir dos dados do Quadro 4.3, plotou-se os gráficos linearizados para cada uma das ordens cinéticas, de acordo com as Figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10.

**Figura 4.6: Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 15,0°C.**



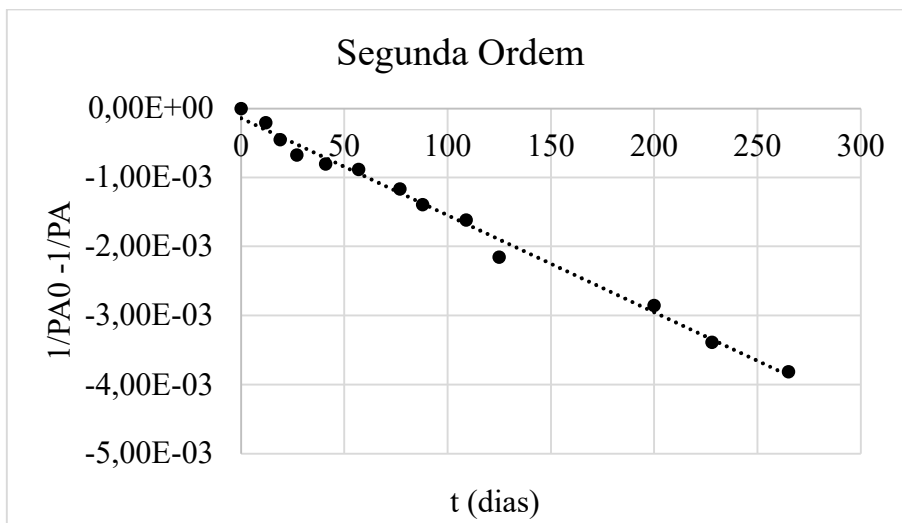
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.7: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.**



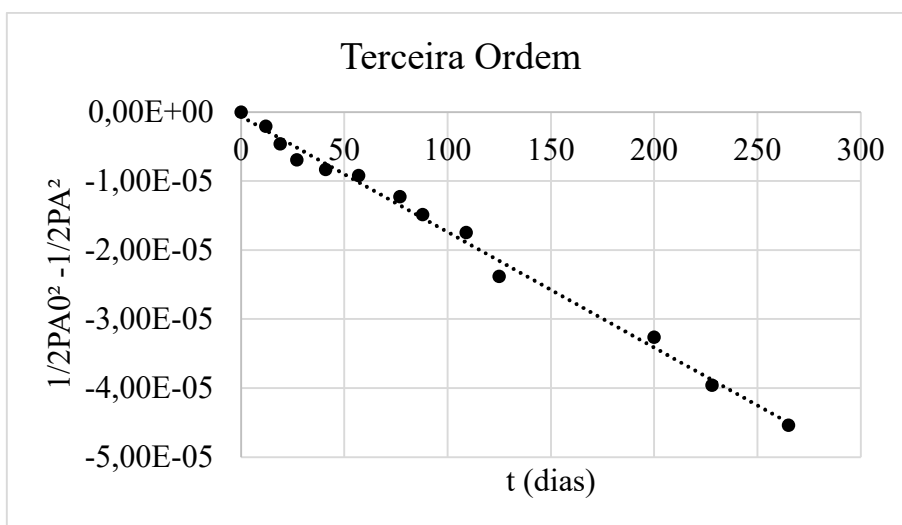
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.8: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.**



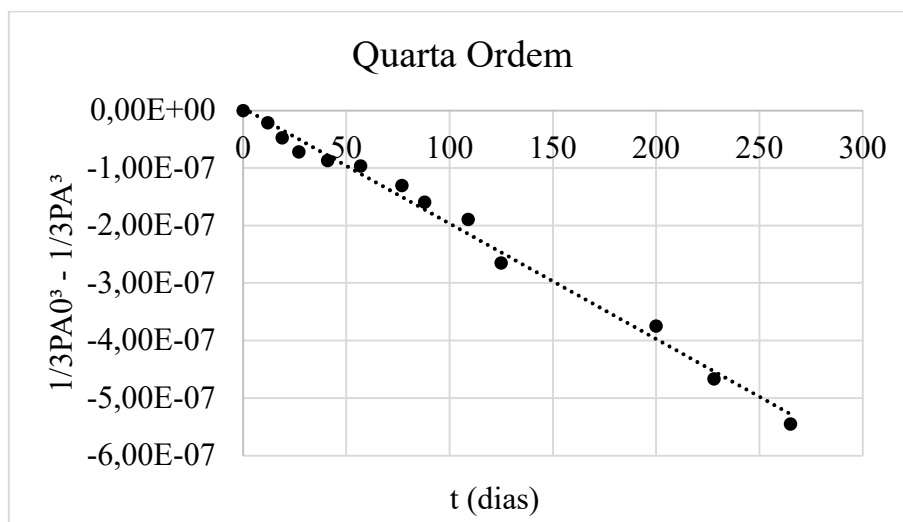
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.9: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.10: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 15,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

Os valores das constantes de velocidade (k) para cada uma das ordens cinéticas provenientes das equações linearizadas, referentes à temperatura de aceleração de 15,0°C, do teste de Chagas ELISA, bem como dos respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão demonstrados no Quadro 4.4.

**Quadro 4.4: Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação  $R^2$  para temperatura de 15,0°C.**

Ordem cinética	Equação da reta	k [unidade de densidade/tempo]	$R^2$
0	$y = -0,1009x - 2,4216$	$1,01 \cdot 10^{-1}$	0,9771
1	$y = -0,0012x - 0,0199$	$1,20 \cdot 10^{-3}$	0,9863
2	$y = -1E-05x - 0,0001$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	0,9915
3	$y = -2E-07x - 6E-07$	$2,00 \cdot 10^{-7}$	0,9928
4	$y = -2E-09x + 4E-09$	$2,00 \cdot 10^{-9}$	0,9905

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os dados do Quadro 4.4, observa-se que o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) teve seu valor mais próximo de 1, para a 3ª ordem cinética, o que indica que o modelo de terceira ordem mais se aproximou dos dados experimentais, para a temperatura de aceleração de 15,0°C.

O Quadro 4.5 relaciona os dados experimentais de densidade óptica em função do tempo às supostas ordens cinéticas, para a condição de aceleração, a uma temperatura de

25,0°C do teste de Chagas ELISA.

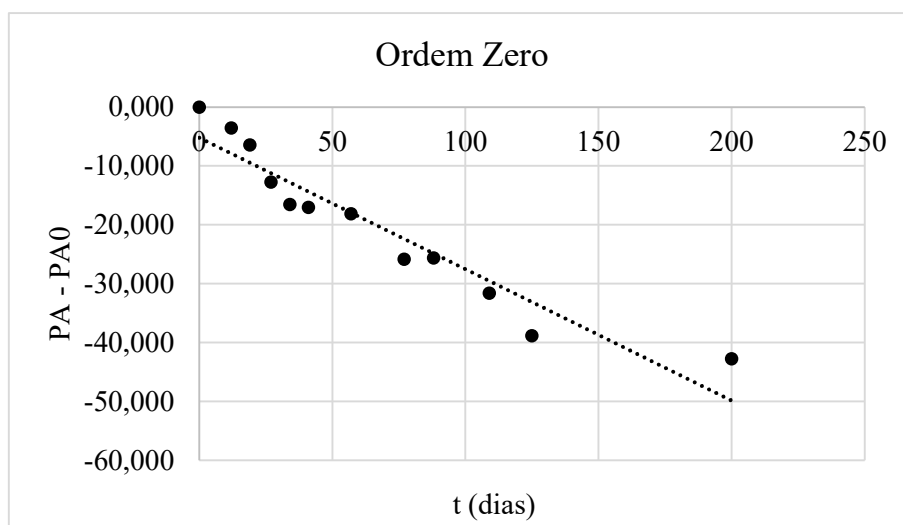
**Quadro 4.5: Dados de densidade óptica em função do tempo, na temperatura de aceleração de 25,0°C, para o teste de Chagas ELISA.**

Tempo (dias)	Ordens Cinéticas					
	Densidade Óptica (%)	0 $P_A - P_{A0}$	1 <sup>a</sup> $\ln[P_A/P_{A0}]$	2 <sup>a</sup> $1/P_{A0} - 1/P_A$	3 <sup>a</sup> $1/2 \cdot (P_{A0})^2 \cdot 1/2 \cdot (P_A)^2$	4 <sup>a</sup> $1/3 \cdot (P_{A0})^3 - 1/2 \cdot (P_A)^3$
0	100,00	0,00	0,000	0,000E+00	0,000E+00	0,000E+00
12	96,50	-3,50	-0,036	-3,627E-04	-3,693E-06	-3,760E-08
19	93,60	-6,40	-0,066	-6,838E-04	-7,071E-06	-7,316E-08
27	87,30	-12,70	-0,136	-1,455E-03	-1,561E-05	-1,677E-07
34	83,50	-16,50	-0,180	-1,976E-03	-2,171E-05	-2,392E-07
41	83,00	-17,00	-0,186	-2,048E-03	-2,258E-05	-2,496E-07
57	81,90	-18,10	-0,200	-2,210E-03	-2,454E-05	-2,734E-07
77	74,20	-25,80	-0,298	-3,477E-03	-4,082E-05	-4,826E-07
88	74,40	-25,60	-0,296	-3,441E-03	-4,033E-05	-4,761E-07
109	68,40	-31,60	-0,380	-4,620E-03	-5,687E-05	-7,083E-07
125	61,20	-38,80	-0,491	-6,340E-03	-8,350E-05	-1,121E-06
200	57,30	-42,70	-0,557	-7,452E-03	-1,023E-04	-1,438E-06

Fonte: Elaboração própria

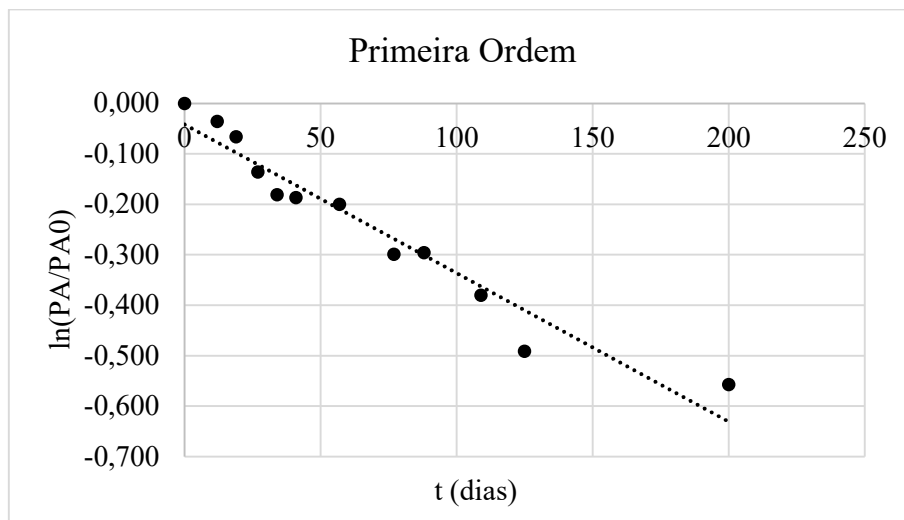
A partir dos dados do Quadro 4.5, plotou-se os gráficos linearizados para cada uma das ordens cinéticas, de acordo com as Figuras 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15.

**Figura 4.11: Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 25,0°C.**



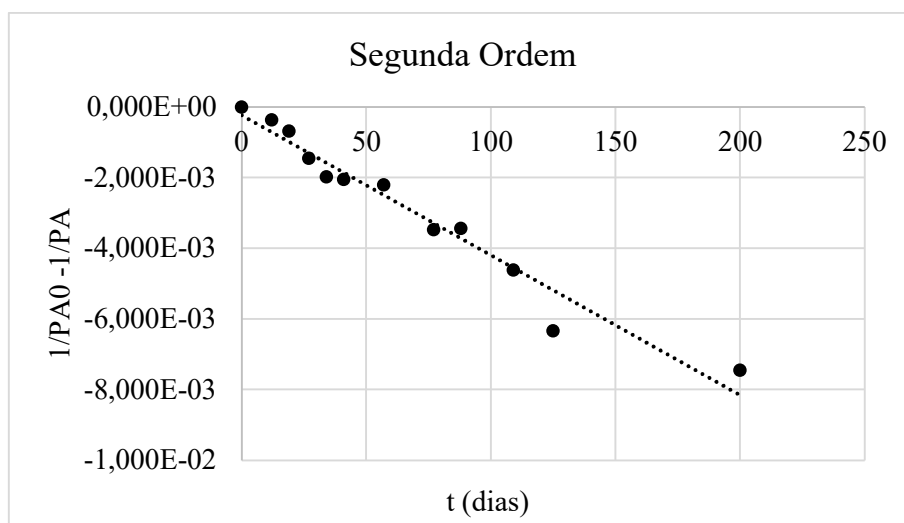
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.12: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.**



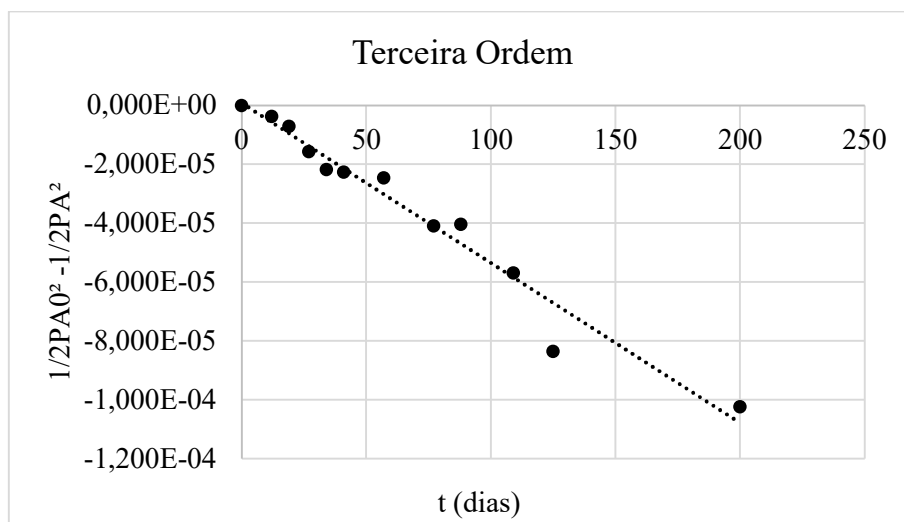
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.13: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.**



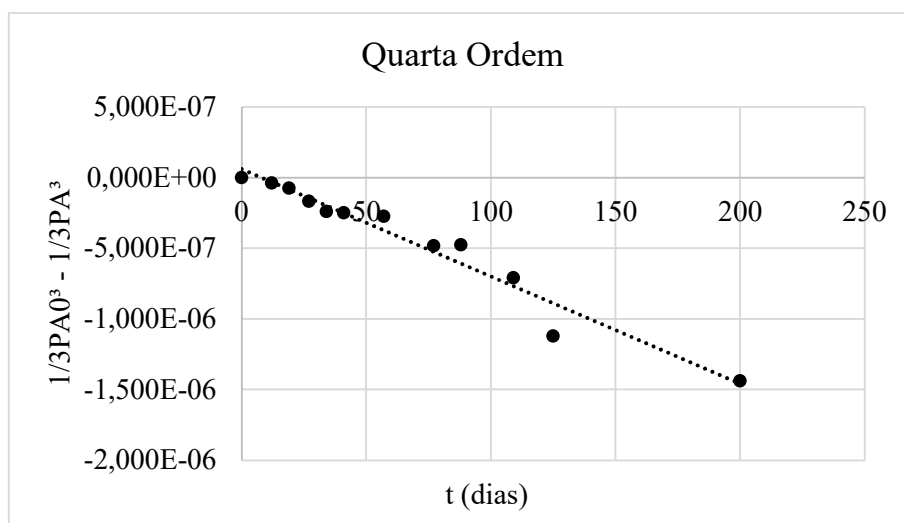
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.14: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.15: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 25,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

Os valores das constantes de velocidade (k) para cada uma das ordens cinéticas provenientes das equações linearizadas, referentes à temperatura de aceleração de 25,0°C, do teste de Chagas ELISA, bem como dos respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão demonstrados no Quadro 4.6.

**Quadro 4.6 Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação  $R^2$  para temperatura de 25,0°C.**

Ordem cinética	Equação da reta	k [unidade de densidade/tempo]	$R^2$
0	$y = -0,2232x - 5,2138$	$2,23 \cdot 10^{-1}$	0,9109
1	$y = -0,0029x - 0,0418$	$2,90 \cdot 10^{-3}$	0,9406
2	$y = -4E-05x - 0,0002$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	0,9582
3	$y = -5E-07x + 8E-07$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	0,9635
4	$y = -8E-09x + 6E-08$	$8,00 \cdot 10^{-9}$	0,9579

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os dados do Quadro 4.6, observa-se que o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) teve seu valor mais próximo de 1, para a 3ª ordem cinética, o que indica que o modelo de terceira ordem mais se aproximou dos dados experimentais, para a temperatura de aceleração de 25,0°C.

O Quadro 4.7 relaciona os dados experimentais de densidade óptica em função do tempo às supostas ordens cinéticas, para a condição de aceleração, a uma temperatura de 35,0°C do teste de Chagas ELISA.

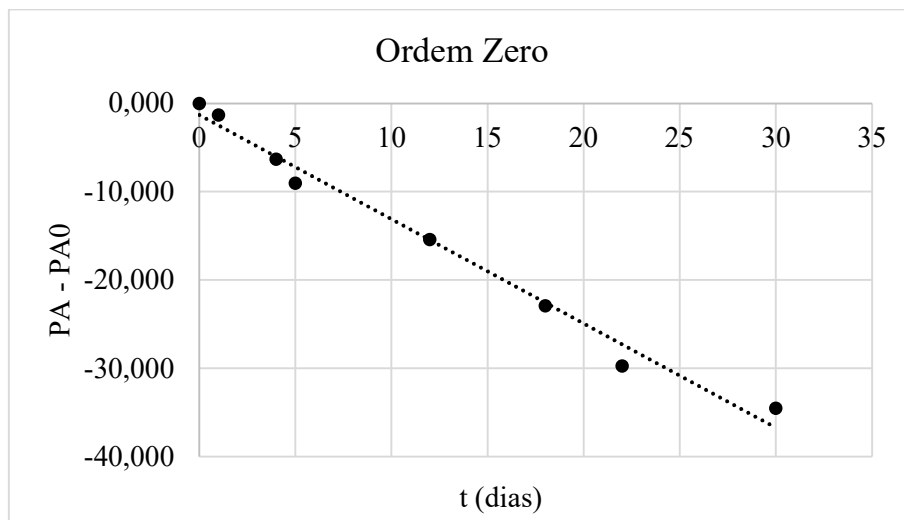
**Quadro 4.7: Dados de densidade óptica em função do tempo, na temperatura de aceleração de 35,0°C, para o teste de Chagas ELISA.**

Tempo (dias)	Ordens Cinéticas					
	Densidade Óptica (%)	0 $P_A - P_{A0}$	1ª $\ln[P_A/P_{A0}]$	2ª $1/P_{A0} - 1/P_A$	3ª $1/2 \cdot (P_{A0})^2 - 1/2 \cdot (P_A)^2$	4ª $1/3 \cdot (P_{A0})^3 - 1/2 \cdot (P_A)^3$
0	100,00	0,00	0,000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1	98,70	-1,30	-0,013	-1,32E-04	-1,33E-06	-1,33E-08
4	93,70	-6,30	-0,065	-6,72E-04	-6,95E-06	-7,19E-08
5	91,00	-9,00	-0,094	-9,89E-04	-1,04E-05	-1,09E-07
12	84,60	-15,40	-0,167	-1,82E-03	-1,99E-05	-2,17E-07
18	77,10	-22,90	-0,260	-2,97E-03	-3,41E-05	-3,94E-07
22	70,30	-29,70	-0,352	-4,22E-03	-5,12E-05	-6,26E-07
30	65,50	-34,50	-0,423	-5,27E-03	-6,65E-05	-8,53E-07

Fonte: Elaboração própria

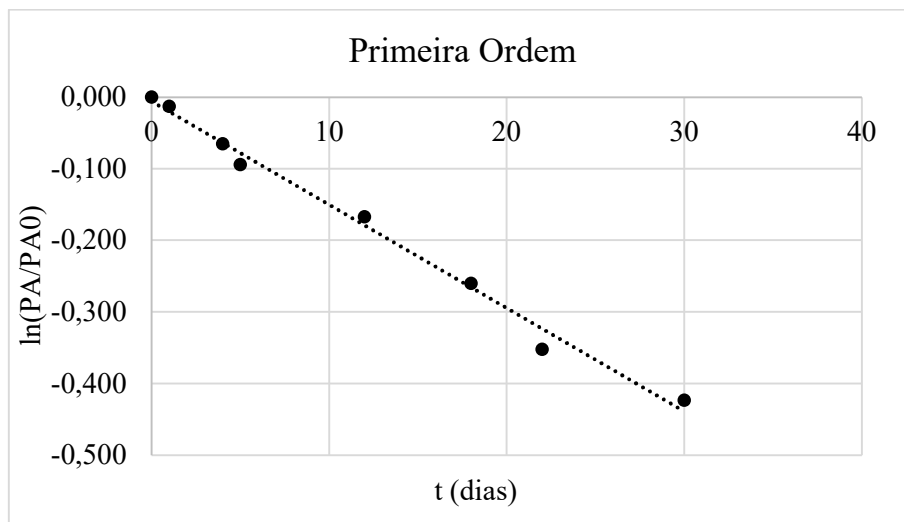
A partir dos dados do Quadro 4.7, plotou-se os gráficos linearizados para cada uma das ordens cinéticas, de acordo com as Figuras 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20.

**Figura 4.16: Dados de densidade óptica em função do tempo, para ordem cinética zero, na temperatura de aceleração de 35,0°C.**



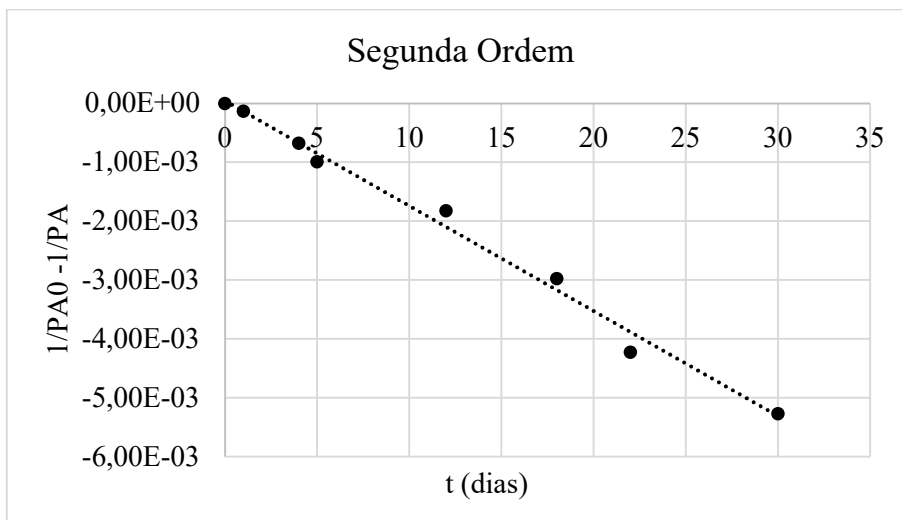
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.17: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 1ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.**



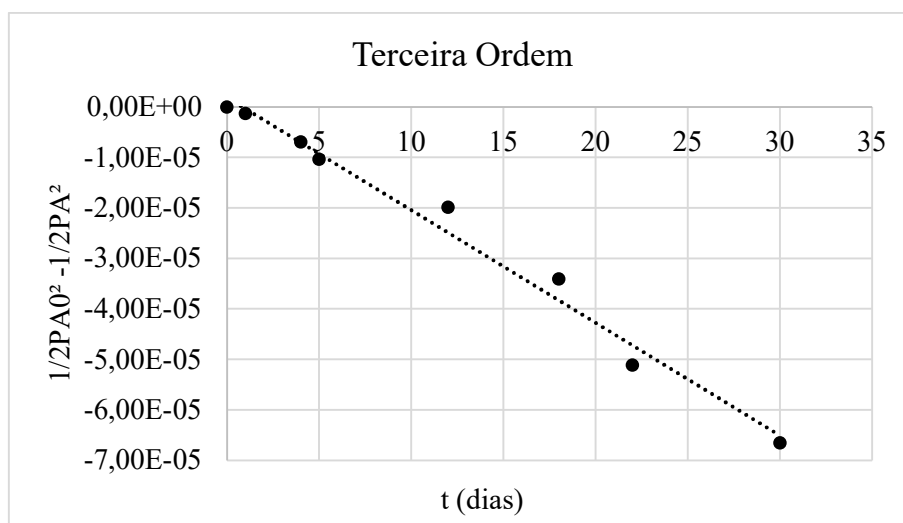
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.18: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 2ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.**



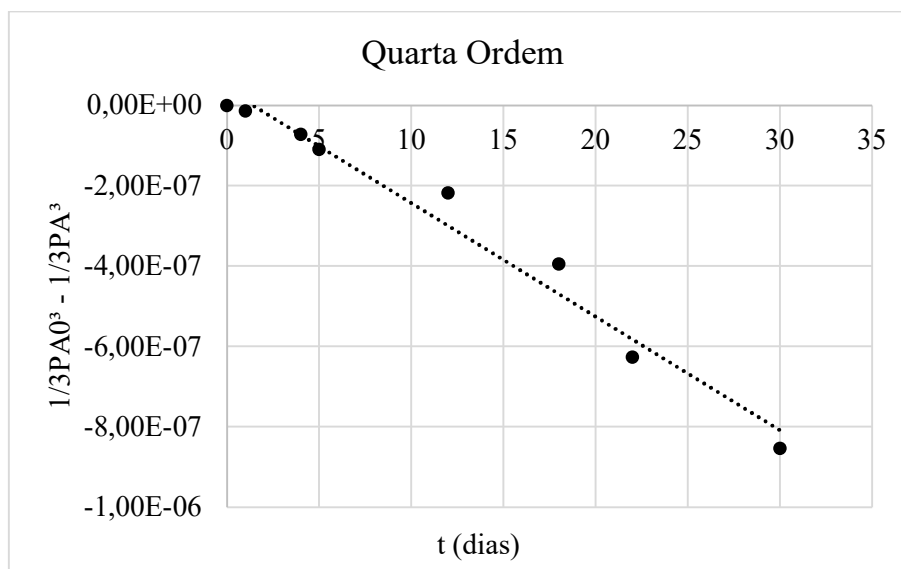
Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.19: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 3ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

**Figura 4.20: Dados de densidade óptica em função do tempo, para 4ª ordem cinética, na temperatura de aceleração de 35,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

Os valores das constantes de velocidade ( $k$ ) para cada uma das ordens cinéticas provenientes das equações linearizadas, referentes à temperatura de aceleração de 35,0°C, do teste de Chagas ELISA, bem como dos respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão demonstrados no Quadro 4.8.

**Quadro 4.8: Valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação  $R^2$  para temperatura de 35,0°C.**

Ordem cinética	Equação da reta	$k$ [unidade de densidade/tempo]	$R^2$
0	$y = -1,1809x - 1,3069$	$1,18 \cdot 10^0$	0,9854
1	$y = -0,0144x - 0,006$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	0,9908
2	$y = -0,0002x + 4E-05$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	0,9904
3	$y = -2E-06x + 2E-06$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	0,9843
4	$y = -3E-08x + 4E-08$	$3,00 \cdot 10^{-8}$	0,9729

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os dados do Quadro 4.8, observa-se que o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) teve seu valor mais próximo de 1, para a 1ª ordem cinética, o que indica que o modelo de primeira ordem mais se aproximou dos dados experimentais, para a temperatura de aceleração de 35,0°C.

Nesse último caso, houve mudança de ordem cinética e, tem-se uma mudança

significativa em termos de grandeza, já que nas temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C, a constante cinética tem uma ordem de grandeza de  $10^{-7}$ , enquanto na temperatura de 35,0°C, a ordem de grandeza é de  $10^{-2}$ . Dessa forma, para o cálculo da energia de ativação ( $E_{atv}$ ), por meio do gráfico, que relaciona o  $\ln(k)$  em função de  $1/T$ , deve-se considerar apenas os valores das constantes cinéticas para as temperaturas de armazenamento de 5,0°C e aceleradas de 15,0°C e 25,0°C, pois o ponto referente à temperatura de 35,0°C seria discrepante em relação aos pontos anteriores.

O Quadro 4.9 relaciona os dados de densidade óptica coletados e o tratamento de dados realizados de acordo com a Equação 3.10, para a temperatura de armazenamento de 5,0°C.

**Quadro 4.9: Dados da função objetivo para a temperatura de armazenamento de 5,0°C.**

Densidade Óptica	Tempo (dias)	$X_0$ (dias)	$(X_0)^2$ (dias) <sup>2</sup>	yexp [densidade]	$(yexp).X_0$ [densidade. Dias]	$\hat{y} = a_0.X_0$ [1/densidade]	$\hat{y} - yexp$ [1/densidade]
100,00	0	0	0	0	0	0	0
100,00	12	12	144,0	0,00E+00	0,00E+00	1,55E-06	1,55E-06
98,60	19	19	361,0	1,43E-06	2,72E-05	2,46E-06	1,03E-06
99,00	27	27	729,0	1,02E-06	2,74E-05	3,50E-06	2,48E-06
96,90	41	41	1681,0	3,25E-06	1,33E-04	5,31E-06	2,06E-06
95,60	57	57	3249,0	4,71E-06	2,68E-04	7,38E-06	2,68E-06
94,20	77	77	5929,0	6,35E-06	4,89E-04	9,98E-06	3,63E-06
92,00	88	88	7744,0	9,07E-06	7,98E-04	1,14E-05	2,33E-06
90,30	109	109	11881,0	1,13E-05	1,23E-03	1,41E-05	2,80E-06
86,20	125	125	15625,0	1,73E-05	2,16E-03	1,62E-05	-1,10E-06
81,50	200	200	40000,0	2,53E-05	5,06E-03	2,59E-05	6,35E-07
79,70	228	228	51984,0	2,87E-05	6,55E-03	2,95E-05	8,24E-07
75,60	265	265	70225,0	3,75E-05	9,93E-03	3,43E-05	-3,15E-06
69,50	404	404	163216,0	5,35E-05	2,16E-02	5,23E-05	-1,17E-06
<b>Soma</b>			<b>372768,0</b>		<b>4,83E-02</b>		

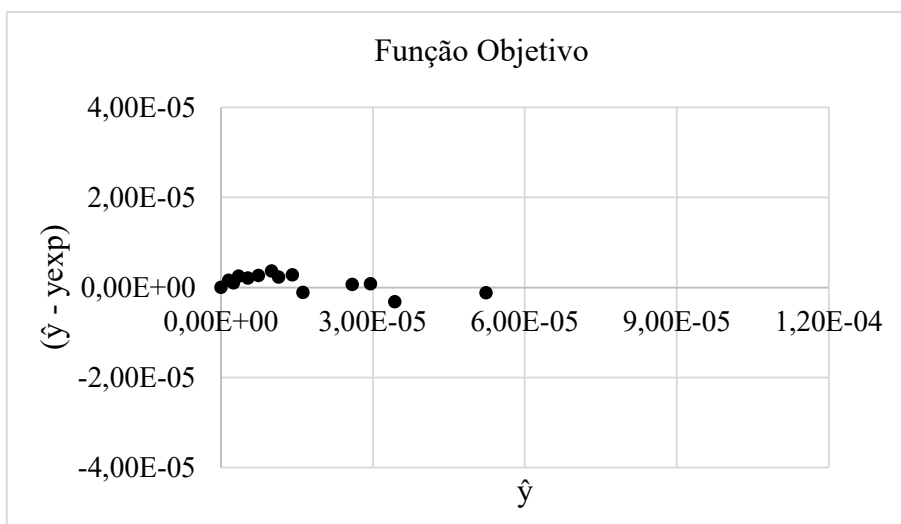
Fonte: Elaboração própria

De acordo com o quadro 4.9, o valor da constante cinética para a temperatura de armazenamento de 5,0°C tem valor de  $k$  igual a  $1,30.10^{-7}$  [1/ (densidade. dias)].

A Figura 4.21 evidencia a baixa dispersão dos dados quando se considera a ordem 3 para o modelo cinético, quando comparada com os dados experimentais. Verifica-se ainda, que o valor da constante cinética pelo método integral e função objetivo, sendo respectivamente de  $1,00.10^{-7}$  e  $1,30.10^{-7}$  [1/ (densidade. dias)], estão relativamente

próximos, ao menos quando se compara a ordem de grandeza.

**Figura 4.21: Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 5,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

O Quadro 4.10 relaciona os dados de densidade óptica coletados e o tratamento de dados realizados de acordo com a Equação 3.10, para a temperatura de aceleração de 15,0°C.

**Quadro 4.10: Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 15,0°C.**

Densidade Óptica	Tempo (dias)	X <sub>0</sub> (dias)	(X <sub>0</sub> ) <sup>2</sup> (dias) <sup>2</sup>	yexp [densidade]	(yexp).X <sub>0</sub> [densidade. Dias]	$\hat{y} = a_0.X_0$ [1/densidade]	$\hat{y} - y_{exp}$ [1/densidade]
100,00	0	0	0	0	0	0	0
98,00	12	12	144,0	2,06E-06	2,47E-05	2,05E-06	-7,19E-09
95,70	19	19	361,0	4,59E-06	8,73E-05	3,25E-06	-1,34E-06
93,70	27	27	729,0	6,95E-06	1,88E-04	4,62E-06	-2,33E-06
92,60	41	41	1681,0	8,31E-06	3,41E-04	7,02E-06	-1,29E-06
91,90	57	57	3249,0	9,20E-06	5,25E-04	9,76E-06	5,56E-07
89,60	77	77	5929,0	1,23E-05	9,46E-04	1,32E-05	9,02E-07
87,80	88	88	7744,0	1,49E-05	1,31E-03	1,51E-05	2,05E-07
86,10	109	109	11881,0	1,74E-05	1,90E-03	1,87E-05	1,21E-06
82,30	125	125	15625,0	2,38E-05	2,98E-03	2,14E-05	-2,42E-06
77,80	200	200	40000,0	3,26E-05	6,52E-03	3,42E-05	1,63E-06
74,70	228	228	51984,0	3,96E-05	9,03E-03	3,90E-05	-5,70E-07
72,40	265	265	70225,0	4,54E-05	1,20E-02	4,54E-05	-1,87E-08
<b>Soma</b>			<b>209552,0</b>		<b>3,59E-02</b>		

Fonte: Elaboração própria



**Quadro 4.11: Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 25,0°C.**

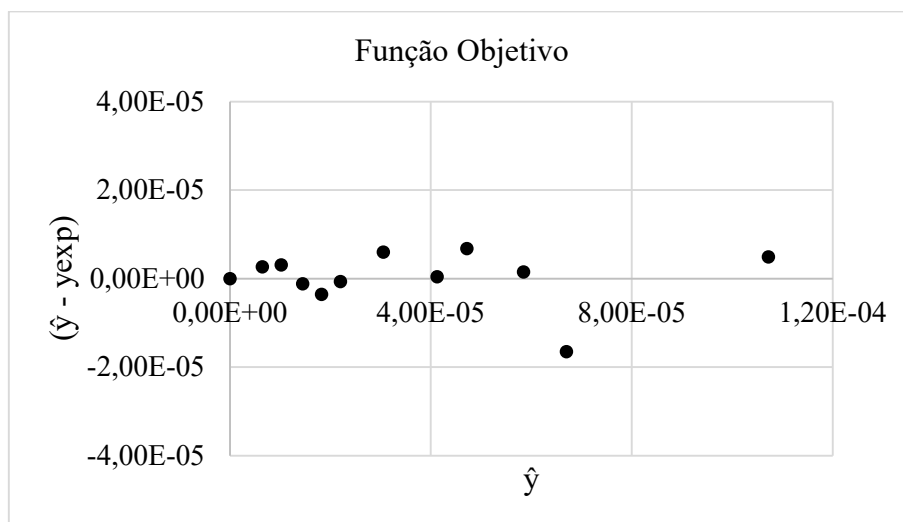
Densidade Óptica	Tempo (dias)	X <sub>0</sub> (dias)	(X <sub>0</sub> ) <sup>2</sup> (dias) <sup>2</sup>	y <sub>exp</sub> [densidade]	(y <sub>exp</sub> ).X <sub>0</sub> [densidade. Dias]	$\hat{y} = a_0.X_0$ [1/densidade]	$\hat{y} - y_{exp}$ [1/densidade]
100,00	0	0	0	0	0	0	0
96,50	12	12	144,0	3,69E-06	4,43E-05	6,43E-06	2,74E-06
93,60	19	19	361,0	7,07E-06	1,34E-04	1,02E-05	3,12E-06
87,30	27	27	729,0	1,56E-05	4,21E-04	1,45E-05	-1,13E-06
83,50	34	34	1156,0	2,17E-05	7,38E-04	1,82E-05	-3,48E-06
83,00	41	41	1681,0	2,26E-05	9,26E-04	2,20E-05	-5,98E-07
81,90	57	57	3249,0	2,45E-05	1,40E-03	3,06E-05	6,02E-06
74,20	77	77	5929,0	4,08E-05	3,14E-03	4,13E-05	4,67E-07
74,40	88	88	7744,0	4,03E-05	3,55E-03	4,72E-05	6,85E-06
68,40	109	109	11881,0	5,69E-05	6,20E-03	5,84E-05	1,57E-06
61,20	125	125	15625,0	8,35E-05	1,04E-02	6,70E-05	-1,65E-05
57,30	200	200	40000,0	1,02E-04	2,05E-02	1,07E-04	4,94E-06
<b>Soma</b>			<b>88499,0</b>		<b>4,74E-02</b>		

Fonte: Elaboração própria

De acordo com o Quadro 4.11, o valor da constante cinética para a temperatura de aceleração de 25,0°C tem valor de  $k$  igual a  $5,36.10^{-7}$  [1/ (densidade. dias)].

A Figura 4.23 evidencia a baixa dispersão dos dados quando se considera a ordem 3 para o modelo cinético, quando se compara com os dados experimentais. Verifica-se ainda que o valor da constante cinética pelo método integral e função objetivo, sendo respectivamente de  $5,00.10^{-7}$  e  $5,36.10^{-7}$  [1/ (densidade. dias)], estão relativamente próximos, ao menos quando se compara a ordem de grandeza.

**Figura 4.23: Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 25,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

Por fim, o Quadro 4.12 relaciona os dados de densidade óptica coletados e o tratamento de dados realizados de acordo com a Equação 3.10, para a temperatura de aceleração de 35,0°C.

**Quadro 4.12: Dados da função objetivo para a temperatura de aceleração de 35,0°C.**

Densidade Óptica	Tempo (dias)	$X_0$ (dias)	$(X_0)^2$ (dias) <sup>2</sup>	$y_{exp}$ [densidade]	$(y_{exp}).X_0$ [densidade. Dias]	$\hat{y} = a_0.X_0$ [1/densidade]	$\hat{y} - y_{exp}$ [1/densidade]
100,00	0	0	0	0	0	0	0
98,70	1	1	1,0	1,31E-02	1,31E-02	1,47E-02	1,63E-03
93,70	4	4	16,0	6,51E-02	2,60E-01	5,89E-02	-6,19E-03
91,00	5	5	25,0	9,43E-02	4,72E-01	7,36E-02	-2,07E-02
84,60	12	12	144,0	1,67E-01	2,01E+00	1,77E-01	9,40E-03
77,10	18	18	324,0	2,60E-01	4,68E+00	2,65E-01	4,89E-03
70,30	22	22	484,0	3,52E-01	7,75E+00	3,24E-01	-2,86E-02
65,50	30	30	900,0	4,23E-01	1,27E+01	4,42E-01	1,85E-02
<b>Soma</b>			<b>1894,0</b>		<b>2,79E+01</b>		

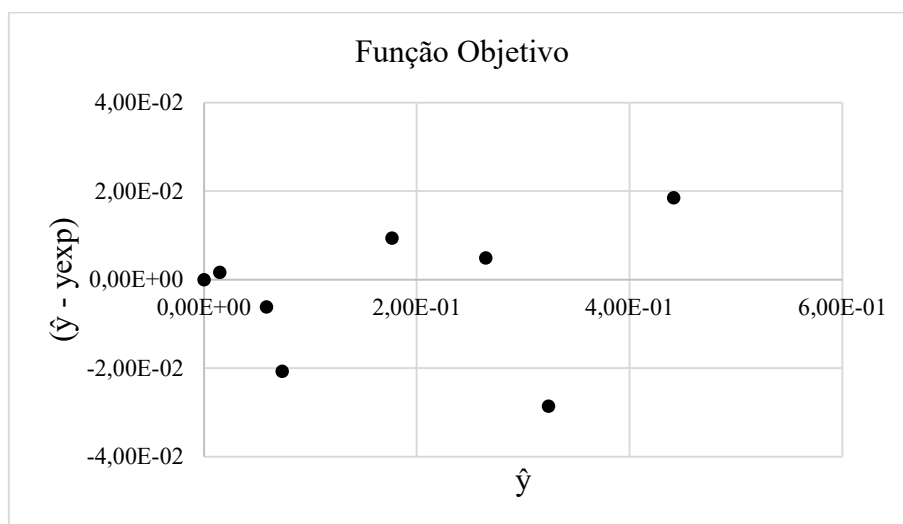
Fonte: Elaboração própria

De acordo com o Quadro 4.12, o valor da constante cinética para a temperatura de aceleração de 35,0°C tem valor de  $k$  igual a  $1,47.10^{-2}$  [1/ (densidade. dias)].

A Figura 4.24 evidencia a relativa baixa dispersão dos dados quando se considera a ordem 1 para o modelo cinético, quando se compara com os dados experimentais. Verifica-

se ainda que o valor da constante cinética pelo método integral e função objetivo, sendo respectivamente de  $1,44 \cdot 10^{-2}$  e  $1,47 \cdot 10^{-2}$  [1/ (densidade. dias)], estão relativamente próximos, ao menos quando se compara a ordem de grandeza.

**Figura 4.24: Comparação dos dados experimentais com o modelo cinético de terceira ordem proposto para temperatura de 35,0°C.**



Fonte: Elaboração própria

A partir dos valores das constantes cinéticas, obtidas através dos métodos de análise integral e função objetivo, com análise da dispersão de dados, pode-se determinar a energia de ativação ( $E_{atv}$ ), por meio da Equação 3.11, que representa a Equação de Arrhenius linearizada. De acordo com a equação, linearizando os dados de temperatura absoluta para  $1/T$  e da aplicação do logaritmo natural nos valores das constantes cinéticas, para as temperaturas de 5,0°C, 15,0°C e 25,0°C, que mantém a ordem cinética, é possível determinar a energia de ativação ( $E_{atv}$ ), por meio do coeficiente angular da reta em um gráfico de  $\ln(k)$  versus  $1/T$ .

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.11)$$

O Quadro 4.13 relaciona os dados das temperaturas com os respectivos valores das constantes cinéticas linearizadas, para o método de análise integral.

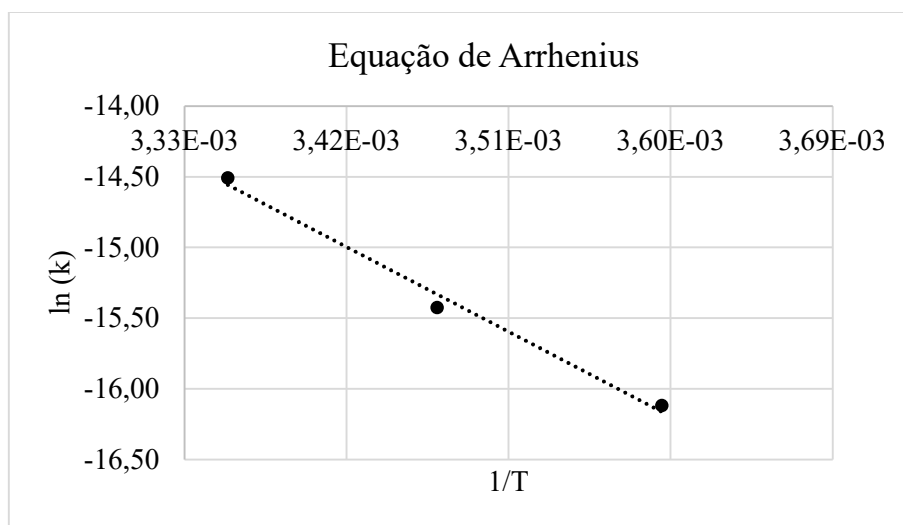
**Quadro 4.13: Dados de temperaturas e constantes cinéticas linearizados para o método de análise integral.**

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	k 1/[densidade.dias]	1/T	ln(k)	$\alpha$ (-)
5	278,15	1,00E-07	3,60E-03	-16,12	
15	288,15	2,00E-07	3,47E-03	-15,42	<b>2,00</b>
25	298,15	5,00E-07	3,35E-03	-14,51	<b>5,00</b>

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os valores do Quadro 4.13, plotou-se o gráfico de  $\ln(k)$  em função de  $1/T$ , de acordo com a equação de Arrhenius, obtendo-se valores do coeficiente angular e coeficiente de determinação  $R^2$  iguais a  $-6660,2$  e  $0,9901$ , respectivamente, como apresentado na Figura 4.25.

**Figura 4.25: Dados de  $\ln(k)$  em função de  $1/T$ , de acordo com a equação de Arrhenius, para o método de análise integral.**



Fonte: Elaboração própria

De acordo com a Equação 3.11, pode-se determinar o valor de energia de ativação ( $E_{atv}$ ), multiplicando o valor do coeficiente angular da reta ( $-6660,2$ ) pela constante dos gases ideais  $R$ , considerada igual  $8,314 \cdot 10^{-3}$  kJ/mol.k, resultando em um valor de  $55,37$  kJ/mol ou  $13225,82$  cal/mol.

O Quadro 4.14 apresenta os valores da constante dos gases ideais, do coeficiente angular da reta da Figura 4.25, bem como os valores de energia de ativação e do fator de aceleração  $\alpha_{10}$ .

**Quadro 4.14: Valores de energia de ativação e fator de aceleração  $\alpha_{10}$  para o método de análise integral.**

R (kJ/mol/K)	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	Ea (cal/mol)	$\alpha_{10}$
<b>0,008314</b>	-6660,2	55,37	13225,82	2,30

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os valores do Quadro 4.14, o fator de aceleração  $\alpha_{10}$  assumiu um valor de 2,30, relativamente próximo ao valor estabelecido pela ANVISA. Além disso, é importante notar que, o valor de energia de ativação (Eatv) de 55,38 kJ/mol está próximo do intervalo considerado por LABUZA (1982) para a diversidade de produtos da área da saúde.

O Quadro 4.15 relaciona os dados das temperaturas com os respectivos valores das constantes cinéticas linearizadas, para o método da função objetivo com análise de distribuição de dados.

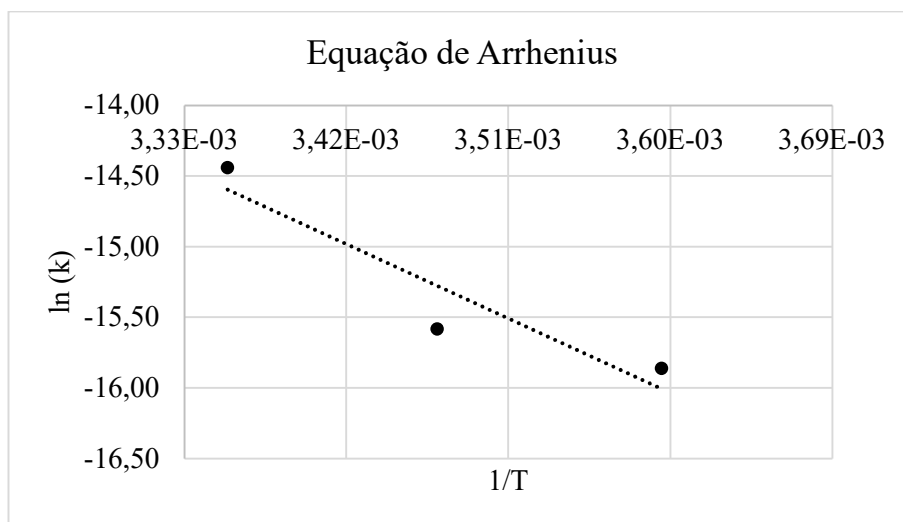
**Quadro 4.15: Dados de temperaturas e constantes cinéticas linearizados para o método da função objetivo.**

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	k 1/[densidade.dias]	1/T	ln(k)	$\alpha$ (-)
5	278,15	1,30E-07	3,60E-03	-15,86	
15	288,15	1,71E-07	3,47E-03	-15,58	<b>1,32</b>
25	298,15	5,36E-07	3,35E-03	-14,44	<b>4,14</b>

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os valores do Quadro 4.15, plotou-se o gráfico de ln(k) em função de 1/T, de acordo com a equação de Arrhenius, obtendo-se valores do coeficiente angular e coeficiente de determinação  $R^2$  iguais a -5845,6 e 0,8776, respectivamente, como apresentado na Figura 4.26.

**Figura 4.26: Dados de  $\ln(k)$  em função de  $1/T$ , de acordo com a equação de Arrhenius, para o método da função objetivo.**



Fonte: Elaboração própria

De acordo com a Equação 3.11, pode-se determinar o valor de energia de ativação ( $E_{atv}$ ), multiplicando o valor do coeficiente angular da reta (-5845,6) pela constante dos gases ideais  $R$ , considerada igual  $8,314 \cdot 10^{-3}$  kJ/mol.k, resultando em um valor de 48,60 kJ./mol ou 11608,19 cal/mol.

O Quadro 4.16 apresenta os valores da constante dos gases ideais, do coeficiente angular da reta da Figura 4.26, bem como os valores de energia de ativação e do fator de aceleração  $\alpha_{10}$ .

**Quadro 4.16: Valores de energia de ativação e fator de aceleração  $\alpha_{10}$  para o método de análise integral.**

$R$ (kJ/mol/K)	$-E_a/R$	$E_a$ (kJ/mol)	$E_a$ (cal/mol)	$\alpha_{10}$
0,008314	-5845,6	48,60	11608,19	2,08

Fonte: Elaboração própria

De acordo com os valores do Quadro 4.16, o fator de aceleração  $\alpha_{10}$  assumiu um valor de 2,08, muito próximo ao valor estabelecido pela ANVISA. Além disso, é importante notar que, o valor de energia de ativação ( $E_{atv}$ ) de 48,60 kJ/mol está no intervalo considerado por LABUZA (1982) para a diversidade de produtos da área da saúde.

A partir dos valores das constantes cinéticas, determinou-se os fatores de aceleração  $\alpha$  entre as temperaturas de aceleração de 15,0°C e 25,0°C e a temperatura de armazenamento

de 5,0°C do teste de Chagas ELISA, dado pela razão entre as constantes de velocidade nas referidas temperaturas.

Os valores obtidos, para o método de análise integral foram respectivamente de 2,00 e 5,00, enquanto para a função objetivo com análise de distribuição de dados os valores foram, respectivamente de 1,32 e 4,14. Em comparação com a ANVISA, o método integral teve um resultado convergente com o que o órgão estabelece, já que uma variação de 10,0°C na temperatura provocou um aumento de duas vezes na velocidade de degradação do teste, enquanto na função objetivo o mesmo aumento na temperatura, provocou um aumento na velocidade de degradação do teste por um fator de 1,32, divergindo do resultado da ANVISA.

É importante ressaltar que, embora no método de análise integral o coeficiente de determinação  $R^2$ , de valor igual a 0,9901 tenha assumido um valor mais próximo de 1,00, em comparação com a função objetivo, com valor de  $R^2$  igual a 0,8776, ele não considera de fato a dispersão de dados existente entre os dados experimentais e a lei de velocidade pressuposta, desconsiderando, de certa forma, os erros atribuídos nessa aproximação. Por sua vez, a função objetivo considera os erros da aproximação entre os dados experimentais e a lei teórica através da análise de dispersão de dados, o que indica um valor do coeficiente de determinação  $R^2$  menor, muito embora seu valor ainda é considerado um resultado plausível e o mais próximo da realidade.

De acordo com os valores dos fatores de aceleração  $\alpha$  obtidos, no método de análise integral, para um aumento de 10,0°C na temperatura, o estudo de estabilidade acelerada deve ser realizado por um período de 274 dias, enquanto para um aumento de 20,0°C na temperatura, o estudo de estabilidade acelerada deve ser realizado por um período menor, de 110 dias, aproximadamente. Em outras palavras, para simular a data de validade, de 548 dias, do teste de Chagas ELISA, o cenário mais vantajoso é submetê-lo à temperatura ambiente de 25,0°C por um intervalo de tempo de 110 dias, como mostra o Quadro 4.17.

**Quadro 4.17: Intervalos de tempo, em dias, requerido o estudo de estabilidade acelerada, de acordo com o método de análise integral.**

Temperatura de armazenamento = 5°C			Validade	
<i>Shelf-Life</i> a 15 °C	274,00	dias	<b>548</b>	dias
<i>Shelf-Life</i> a 25°C	109,60	dias	<b>548</b>	dias

Fonte: Elaboração própria

Realizando a mesma análise para a função objetivo, para um aumento de 10,0°C na temperatura, o estudo de estabilidade acelerada deve ser realizado por um período de 415 dias, enquanto para um aumento de 20,0°C na temperatura, o estudo de estabilidade acelerada deve ser realizado por um período menor, de 133 dias, aproximadamente. Em outras palavras, para simular a data de validade, de 548 dias, do teste de Chagas ELISA, o cenário mais vantajoso é submetê-lo à temperatura ambiente de 25,0°C por um intervalo de tempo de 133 dias, como mostra o Quadro 4.18.

**Quadro 4.18: Intervalos de tempo, em dias, requerido o estudo de estabilidade acelerada, de acordo com o método de análise integral.**

Temperatura de armazenamento = 5°C			Validade	
<i>Shelf-Life</i> a 15 °C	414,68	dias	<b>548</b>	dias
<i>Shelf-Life</i> a 25°C	132,42	dias	<b>548</b>	dias

Fonte: Elaboração própria

De acordo com o Quadro 4.18, durante os 133 dias as microplacas devem ser retiradas da condição ambiente, de 25,0°C e testada em intervalos regulares. Caso os testes funcionem de forma adequada, em acordo com os requerimentos da ANVISA, como qualidade e segurança, tanto nas amostras positivas quanto negativas, comprova-se, pelo estudo de estabilidade acelerada que a data de validade do teste é válida e garante ao fornecedor sua eficiência, sendo, portanto, liberada para a comercialização.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir, de acordo com o método da função objetivo, que o valor de energia de ativação ( $E_{atv}$ ) para o teste de Chagas, realizado através da técnica ELISA é de 48,60 kJ/mol, dentro do *range* de 41 a 54 kJ/mol, considerado para os produtos da área da saúde.

Considerando ainda o método da função objetivo, em relação ao fator de aceleração  $\alpha$ , para um aumento de 10,0°C na temperatura, a velocidade de degradação do teste aumentou 1,32 vezes, valor menor que o estabelecido pela ANVISA, que determina um  $\alpha_{10}$  igual a 2,0.

Para o estudo de estabilidade acelerada aplicado ao teste para detecção de Chagas, no cenário mais vantajoso, deve-se submeter as microplacas à temperatura de 25,0°C, durante um período de 133 dias e testá-las em intervalos regulares durante esse intervalo de tempo.

Caso a eficiência do teste esteja dentro dos padrões considerados pela ANVISA, em termos de qualidade e segurança, o produto segue para registro e comercialização.

Apesar de o teste para detecção de Chagas ter se aproximado do que determina a Anvisa, é importante que, para outros produtos a energia de ativação (Eatv) seja determinada com o mesmo rigor aplicado nesse teste, para que posteriormente seja determinado o fator de aceleração  $\alpha$ , que pode assumir valores diferentes de 2,0, como 3,0 ou 4,0, dependendo da velocidade de degradação do complexo reacional. Dessa forma, por meio desse estudo mais robusto pode-se contestar a ANVISA sobre a generalização do fator de aceleração.

Por fim, para os próximos estudos de estabilidade acelerada, independentemente do produto em que seja aplicado, é interessante realizá-lo em intervalos de tempo regulares, para que haja a possibilidade de aplicar o método diferencial para a determinação da constante cinética. Embora também haja limitações, esse método permite obter o valor da constante de velocidade  $k$ , de forma precisa, não apenas considerando ordens cinéticas inteiras, como no método integral e função objetivo. Além disso, caso haja a possibilidade, o estudo pode ser feito com variações menores de temperaturas, como, por exemplo, de 5,0 em 5,0°C, para obter mais pontos experimentais no gráfico da equação de Arrhenius e dessa forma aumentar a precisão e a possibilidade de “descartar” pontos que sejam considerados discrepantes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução – RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002: Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução – RDC nº 36, de 20 de julho de 2013: Das Disposições Iniciais.

ALBINO, R.B. Análise de Degradação de Produto Alimentício. Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), 2018.

ALMEIDA, B.R. SANTILIANO, F.C. Levantamento dos Métodos de Diagnóstico para a Doença de Chagas. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES). 30 de junho de 2012.

AQUINO, J.S. FELIPE, D.F. Avaliação da Estabilidade Acelerada de diferentes Formulações contendo Vitamina C. Revista Saúde e Pesquisa, v.7, n.1, p.119-128, 2014.

BOAROLLI, J.T. BENDER, S. Avaliação da Estabilidade e Concentração do Xampu de Cetoconazol Manipulado em função do Tempo Comparado a um Xampu Comercial. Fag

Journal of Health, 2019, v.1, n.1, p.189.

CORREIA, J.J. GUIMARÃES, G.F. Termodinâmica e Energia Livre de Gibbs. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 25 de janeiro de 2020.

COSTA, H.M. Físico-Química aplicada à Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Janeiro de 2018.

FOGAÇA, J.R.V – MUNDO EDUCAÇÃO - “Processos endotérmicos e exotérmicos”. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/processos-endotermicos-exotermicos.htm>. Acesso em: 06 de julho de 2022.

GUIDI, A.C. MELLO, J.C.P. Estudo de Estabilidade Acelerada de Xarope Fitoterápico. Brazilian Journal of Development, v.6, n.9, p. 918-930, 2020.

KASVI DISTRIBUIDOR. Sistema de tubos de coleta e interferentes na análise de sangue. Disponível em: <https://kasvi.com.br/tubos-de-coleta-interferentes-sangue/>. Acessado em: 30 de agosto de 2022.

LABUZA, T.P. Shelf-Life Dating of Foods. Foods eand Nutrition Press, Westport, 1982.

LICEMPRE – Regulação de Empresas e Produtos, 2021. “Como saber se um produto precisa de registro na ANVISA?” Disponível em: <https://www.licempre.com.br/como-saber-se-um-produto-precisa-de-registro-na-anvisa/>. Acesso em: 05 de julho. 2022.

LIMA, A.O. et al. Métodos de Laboratório aplicados à Clínica. Técnica e Interpretação. 8ª edição. Editora GEN, Rio de Janeiro, 2020.

PEREIRA, M.A. Métodos Cinéticos – Notas de Aula. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2016.

PEDRO, A.M.K. Desenvolvimento do Método Multivariado Acelerado para Determinação do Prazo de Validade de Produtos Unindo Quimiometria e Cinética Química. Universidade de Campinas (Unicamp), março de 2009.

SILVA, J.B. RODRIGUES. J.A.J. NONO. M.C.A. Caracterização de Materiais Catalíticos. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). São José dos Campos. 2008.

SILVA, L.L. Cinética Química: Conceitos e Aplicação de Alguns Experimentos em Laboratório. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Inhumas, 2017.

SILVA. V.H.C. Descrição Alternativa do Comportamento não Arrhenius da Constante Cinética em Sistemas Químicos. Universidade de Brasília (UnB). 13 de dezembro de 2013.