

## 2

### **Materiais, reagentes, instrumentação e métodos.**

#### 2.1

##### **Materiais e reagentes**

A água purificada (resistividade abaixo de  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) foi obtida de um ultra purificador de água da marca Millipore (Massachusetts, EUA) modelo Milli-Q A10 gradiente.

Os padrões analíticos quercetina (QUE), naringenina (NAR), flavona (FLA), kanamicina (KANA), eritromicina (ERI), piraclostrobina (PIRA), azoxistrobina (AZO), kresoxim-metil (KRESO), trifloxistrobina (TRI), fluoxastrobina (FLU), picoxistrobina (PICO), dimoxistrobina (DIMO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (New Jersey, EUA). Os reagentes usados para a polimerização, ácido metacrílico (MAA), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 2,2'-Azobis (2-metilproprionitila) (AIBN), 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), tetraetilortosilicato (TEOS) foram adquiridos da Bioquímica suplementos analíticos (New Jersey, EUA). Os solventes acetonitrila (ACN), metanol grau HPLC, acetona, ácido trifluoracético (TFA), diclorometano (DCM), dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido acético foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Albumina sérica bovina (BSA), ácido tioglicólico (TGA), ácido ascórbico, sorbitol, sacarose, glutamato monossódico, boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), telúrio em pó, cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$ ) e NaOH foram adquiridos da Sigma-Aldrich enquanto a gelatina hidrolizada para fins farmacêuticos foi da Gelita (Brasil), Quercetin plus vitamin C foi obtido da empresa Supplement Spot.

O nitrogênio comercial (99,96%) utilizado na preparação do MIP e na evaporação de solventes foi adquirido da AGA (Brasil).

### **2.1.1.**

#### **Coleta, armazenamento e tratamento das amostras de água de rio, urina, vacina e suplemento alimentar**

As amostras de água foram coletadas no riacho Rainha que passa pelo campus da PUC – Rio, na Gávea. A coleta foi feita em três diferentes pontos e as amostras foram armazenadas em frasco de vidro âmbar previamente rinsados com a própria água de rio. Os tubos foram acondicionados em geladeira para posterior utilização. As amostras foram fortificadas com o pesticida Piraclostrobina para simulação de uma amostra contaminada. Para analisar essas amostras, não foi necessário nenhum procedimento especial além da filtração prévia em cartuchos MIP.

Foram coletadas amostras de urina de uma mesma pessoa do sexo masculino em tubos falcon e os mesmos foram envolvidos em papel alumínio para evitar o contato da amostra com a luz. Os tubos foram mantidos sob refrigeração por no máximo 4h até sua utilização. As amostras de urina foram fortificadas com os analitos de interesse. Não foi preciso nenhum tratamento prévio além da filtração prévia em cartuchos MIP com posterior lavagem com água.

As vacinas contra febre amarela contendo o analito de interesse (adquiridas do Posto de Saúde do Município de Vassouras-RJ) foram mantidas sob refrigeração a temperaturas entre 2 e 8 °C. A vacina foi reconstituída em 5 mL de água estéril para injetáveis no momento da análise.

Os comprimidos de suplemento alimentar empregados para a determinação de QUE foram pesados e as amostras foram preparadas em MeOH utilizando o conteúdo sólido contido nas cápsulas. A retirada dos excipientes insolúveis contidos foi feita através do processo de filtragem. A solução foi acondicionada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração.

## **2.2.**

### **Instrumentação**

#### **2.2.1.**

##### **Cromatógrafo líquido de alta eficiência**

O cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC) série 1200 da marca Agilent Technologies (Japão), foi usado para avaliar o desempenho das abordagens analíticas desenvolvidas. Este equipamento é composto de um degaseificador a vácuo, uma bomba binária SL, um amostrador automático, um

compartimento termostaticado para a coluna, um detector de absorção no UV/vis do tipo arranjo de diodos e outro de fluorescência. As colunas utilizadas foram uma C18 Zorbax Eclipse XDB (4,6 x 250 mm) e (4,6 x 150 mm) com partículas com 5 µm de tamanho médio e a temperatura do forno mantida à 25°C.

### **2.2.2. Espectrometria de luminescência**

Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrômetro de luminescência comercial, modelo LS 55 da Perkin-Elmer (Reino Unido). Este equipamento possui uma lâmpada de xenônio pulsátil com descarga de 20 kW e com 8 µs como fonte de excitação e um detector do tipo tubo fotomultiplicador (PMT). O PMT é do tipo R928 sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm. Os sistemas de monocromadores do tipo Monk-Gillieson cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão.

Em todos os experimentos realizados, os parâmetros do equipamento foram mantidos como indicado a seguir: velocidade de varredura de 1500 nm min<sup>-1</sup>, bandas espectrais de passagem de excitação e emissão em 10 nm.

As medições de fluorescência em solução foram feitas em cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico), previamente limpa e condicionada com cada uma das soluções a serem medidas.

### **2.2.3. Espectrofotômetro de absorção**

Os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro de absorção Lambda 35 da Perkin-Elmer. Este equipamento possui duas lâmpadas, uma de deutério e outra de tungstênio, e um detector do tipo tubo fotomultiplicador.

As medições de absorvância foram feitas em cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico). Em todos os experimentos realizados, os parâmetros do equipamento foram mantidos como indicado: largura da banda espectral de passagem de 1 nm.

### **2.2.4. Espectrômetro de infravermelho**

O modelo usado para as análises dos polímeros foi um FT-IR S100 da Perkin-Elmer com interferômetro para geração de frequência por transformada de Fourier. Os dados foram coletados com intervalos de 0,5 cm<sup>-1</sup> com resolução de

4,0 cm<sup>-1</sup> em quatro varreduras. Os espectros foram obtidos nas regiões do infravermelho médio (4000-370 cm<sup>-1</sup>). Para o infravermelho médio preparou-se pastilhas em KBr.

### **2.2.5. Microscopia de varredura eletrônica (MEV)**

A microscopia de varredura eletrônica foi realizada em um microscópio JEOL-5600 LV. As amostras foram revestidas por pulverização catódica com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm, utilizando um revestidor por crepitação 550 EMS.

### **2.2.6. Equipamentos auxiliares**

Todas as massas foram medidas numa balança analítica da marca Shimadzu (precisão de 0,01 mg) modelo AUW220D (Shimadzu, Tóquio, Japão).

A degaseificação dos solventes para o HPLC foi realizada em um banho ultra-sônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil).

As frações dos polímeros foram separadas em peneiras granulométricas de aço inox da marca Bertel (SP-Labor, São Paulo, Brasil). Os solventes foram eluídos das colunas SPE (cartuchos MIP/NIP) com auxílio de um pressurizador de ar portátil da marca Inalar Compact NS. A maceração dos polímeros foi feita em almofariz de ágata.

Um sistema de extração Soxhlet com cartuchos de papel Whatman nº 1 foi utilizado para a dessorção das moléculas moldes dos MIP.

Para ajustes de pH, foi utilizado um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3, fornecido pela Tecnocon.

Micropipetas automáticas de volumes reguláveis de 5 a 10 µL da Brand (Wertheim, Alemanha) e da Wheaton (Nova Jersey, EUA) foram utilizadas. Micropipetas reguláveis de 100 a 1000 µL e de 20 a 200 µL também da Brand (Wertheim, Alemanha) e balões volumétricos de 5,0 mL e 10,0 mL foram utilizados no preparo das soluções.

## **2.3. Métodos**

### **2.3.1. Preparo de soluções**

#### **2.3.1.1. Soluções padrão de Quercetina, kanamicina, piraclostrobina e amostras.**

Todas as soluções (estoque) padrão dos flavonóides (quercetina, naringerina e flavona) foram preparadas em metanol na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

De acordo com a bula do suplemento quercetina, cada cápsula contém 250,0 mg de quercetina dihidratada e 100,0 mg de vitamina C (ácido ascórbico). A solução estoque do suplemento na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de quercetina (contendo ácido ascórbico) foi preparada em metanol.

O preparo da amostra para a determinação de quercetina em urina foi feito da seguinte maneira: volumes contendo 100,0  $\mu\text{L}$  de urina foram fortificados com 20,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de QUE.

Uma solução estoque de ácido ascórbico em metanol foi preparada na concentração  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Uma solução estoque de BSA na concentração de 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada em água. Uma solução estoque de tampão fosfato de sódio 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  foi preparada em pH 6,9. Soluções estoque de tampão fosfato de sódio 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas em uma escala de pH variando de 6,0 a 10,0.

Soluções estoque de kanamicina em água foram preparadas nas concentrações  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ . As soluções estoque padrão de sorbitol, glutamato de sódio e sacarose foram preparadas em água na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . A solução estoque  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de eritromicina foi preparada em água. As soluções estoque de gelatina foram preparadas em água nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ g mL}^{-1}$  e  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ .

Para preparar as dispersões de trabalho de nanopartículas utilizou-se uma dispersão estoque de CdTe-TGA QDs em pH = 10,9. A solução de hidróxido de sódio foi preparada na concentração 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ .

A amostra da vacina contra febre amarela, contém 10 doses. A vacina foi reconstituída em 5,0 mL de água estéril para injetáveis e desta foram retiradas para as análises alíquotas de 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{L}$ .

Cada dose de 0,5 mL contém, no mínimo 1000 LD<sub>50</sub> (Dose Letal em camundongo) ou o equivalente em PFU (Unidade Formadora de Placa) de vírus vivo atenuado da febre amarela. Na Tabela 3, é descrita a quantidade de todos os componentes presentes da vacina.

Tabela 3 - Composição da vacina contra febre amarela para dose de 0,5 mL.

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
Sacarose	0,8 mg
Glutamato de sódio	4,05 mg
Sorbitol	8,5 mg
Gelatina hidrolisada bovina	5,0 mg
Eritromicina	1,5 µg
kanamicina	5,0 µg

Diluyente: água estéril para injetáveis

Para determinação de Kanamicina em urina foram preparadas amostras contendo 100,0 µL de urina fortificadas com 10,0; 50,0 e 100,0 µL (cada) de uma solução  $1,0 \times 10^{-5}$  g mL<sup>-1</sup> de Kanamicina.

Todas as soluções estoque de piraclostrobina, azoxistrobina, kresoxim-metil, trifloxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina e dimoxistrobina foram preparadas na proporção 20:80 % (v/v) em metanol:água na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$ ,  $2,0 \times 10^{-4}$  e  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> para piraclostrobina e  $1,0 \times 10^{-4}$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> para os demais pesticidas.

O preparo das amostras para a determinação de piraclostrobina em urina foi feito da seguinte forma: volumes contendo 100,0 µL de urina foram fortificados com 15,0 µL de uma solução  $2,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de PIRA.

A determinação de piraclostrobina em amostras de água de rio foi feita em amostras fortificadas com 15,0 µL de solução  $2,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de PIRA. O volume final de cada amostra foi de 50,0 mL. O MIP também foi utilizado para pré-concentrar analito (PIRA).

Todas as soluções preparadas nesse trabalho foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração.

## 2.3.2. Síntese dos MIP

### 2.3.2.1. MIP-Quercetina

O polímero impresso da quercetina baseado nos trabalhos de Chen *et al.*, 2010 e Song *et al.*, 2009 foi preparado a partir de polimerização “in bulk” por interações não-covalentes. Em uma ampola de vidro de 20,0 mL adicionou-se 0,19 g (0,56 mmol) de quercetina, 6,0 mL de DCM, 0,6 mL de DMSO, 0,40 mL (4,64 mmol) de MAA o monômero funcional, 4,38 mL (23,20 mmol) de EGDMA como reagente de ligação cruzada e 2,43 mL (0,51 mmol) de AIBN como iniciador radicalar. A solução resultante foi degaseificada sob fluxo de nitrogênio por 15 minutos, por fim a ampola foi selada e a polimerização foi iniciada termicamente em um banho-maria a 60 °C, por 24 h (Chen *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2009). Após este período, a ampola de vidro foi quebrada e o polímero foi pulverizado em um almofariz. A remoção do analito foi feita utilizando um aparelho extrator de Soxhlet. Um cartucho de papel whatman contendo todo o polímero resultante da síntese foi colocado no aparelho. Foi utilizada uma mistura metanol e ácido acético, 9:1 % (v/v) (Xia *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009), como solvente extrator para a retirada do analito utilizando um aparelho extrator de Soxhlet. Posteriormente, o polímero foi seco a 60 °C e peneirado, para obter partículas de tamanhos regulares com diâmetros entre 53 e 75 µm. O mesmo foi estocado à temperatura ambiente. Um polímero não impresso NIP (sem adição de quercetina) foi preparado e tratado de forma idêntica à do MIP. Na Figura 10 encontra-se o fluxograma da síntese do MIP-QUE

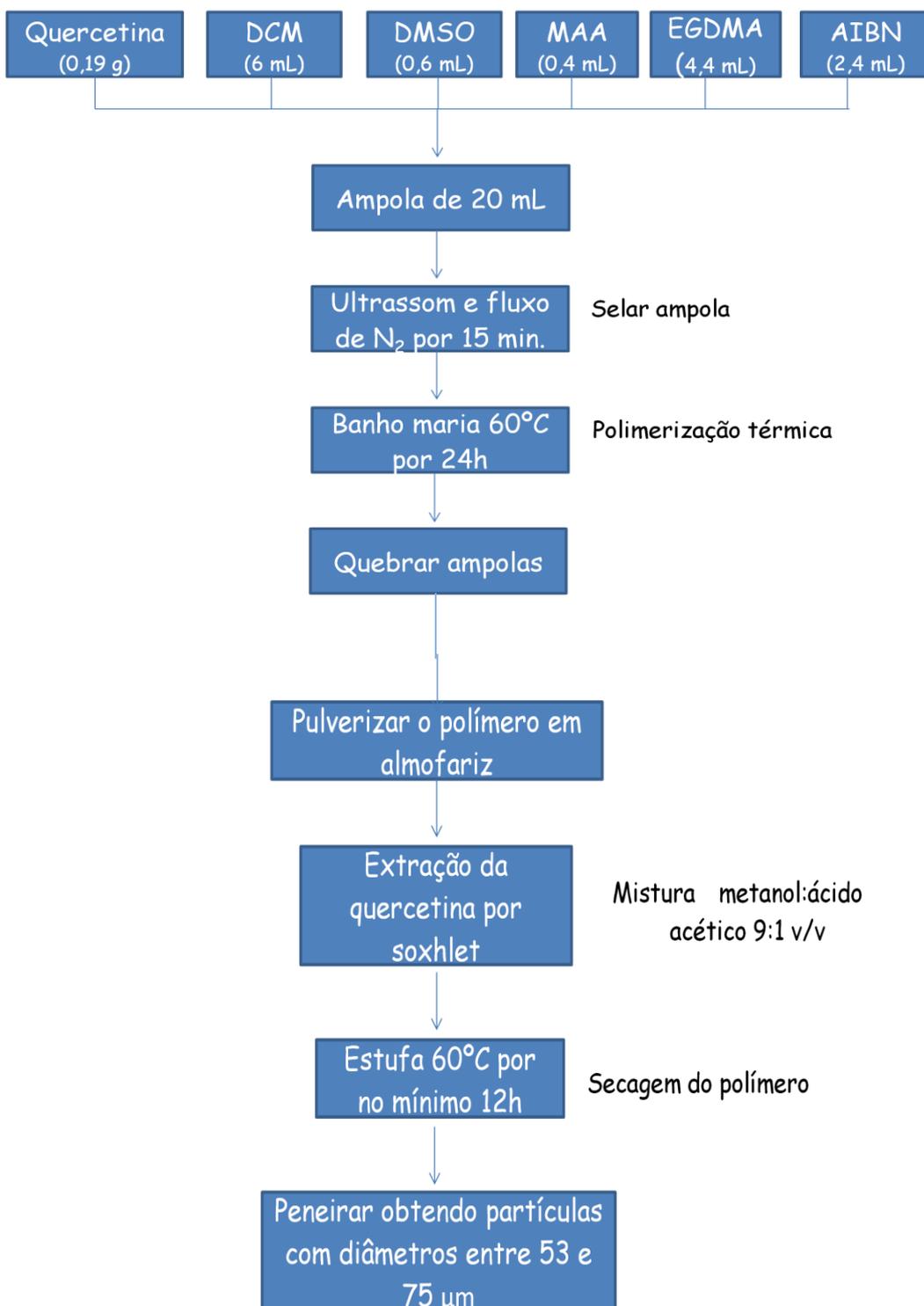


Figura 10 – Síntese do MIP-QUE (matriz acrílica)

### 2.3.2.2. MIP-Kanamicina

O polímero impresso de KANA foi feito baseado no trabalho de Silva, 2009).

A uma mistura de 320,0  $\mu\text{L}$  de APTMS e 265,0  $\mu\text{L}$  de TEOS, foi adicionado 1,0 mL de solução aquosa saturada de kanamicina e 200,0  $\mu\text{L}$  de uma solução 5% de ácido trifluoracético (adicionado como catalisador). Os reagentes foram misturados e agitados por 5 minutos em um agitador vortex. A mistura foi aquecida sob agitação magnética a 40<sup>o</sup> C até aparecimento da turbidez. Posteriormente o material resultante foi resfriado a temperatura ambiente e um gel foi obtido. Este gel foi mantido por 12 horas em estufa a uma temperatura de 120<sup>o</sup> C. Após este período, o polímero foi pulverizado em um almofariz. A remoção do analito foi feita com 200,0 mL de água em um sistema de filtração simples e o eluato foi monitorado em espectrofluorímetro através da sonda fluorescente CdTe-TGA QDs ( $\lambda_{\text{ex}}$  350 nm) até não mais ser observado sinal analítico inerente à kanamicina. Finalmente o polímero foi seco a 120<sup>o</sup>C e então peneirado para obtenção de partículas de tamanhos regulares com diâmetros até 106  $\mu\text{m}$ , o mesmo foi estocado à temperatura ambiente. Um polímero não impresso NIP (sem adição de kanamicina) foi preparado e tratado de forma idêntica à do MIP. Na Figura 11 podemos ver o fluxograma da síntese do MIP-KANA.

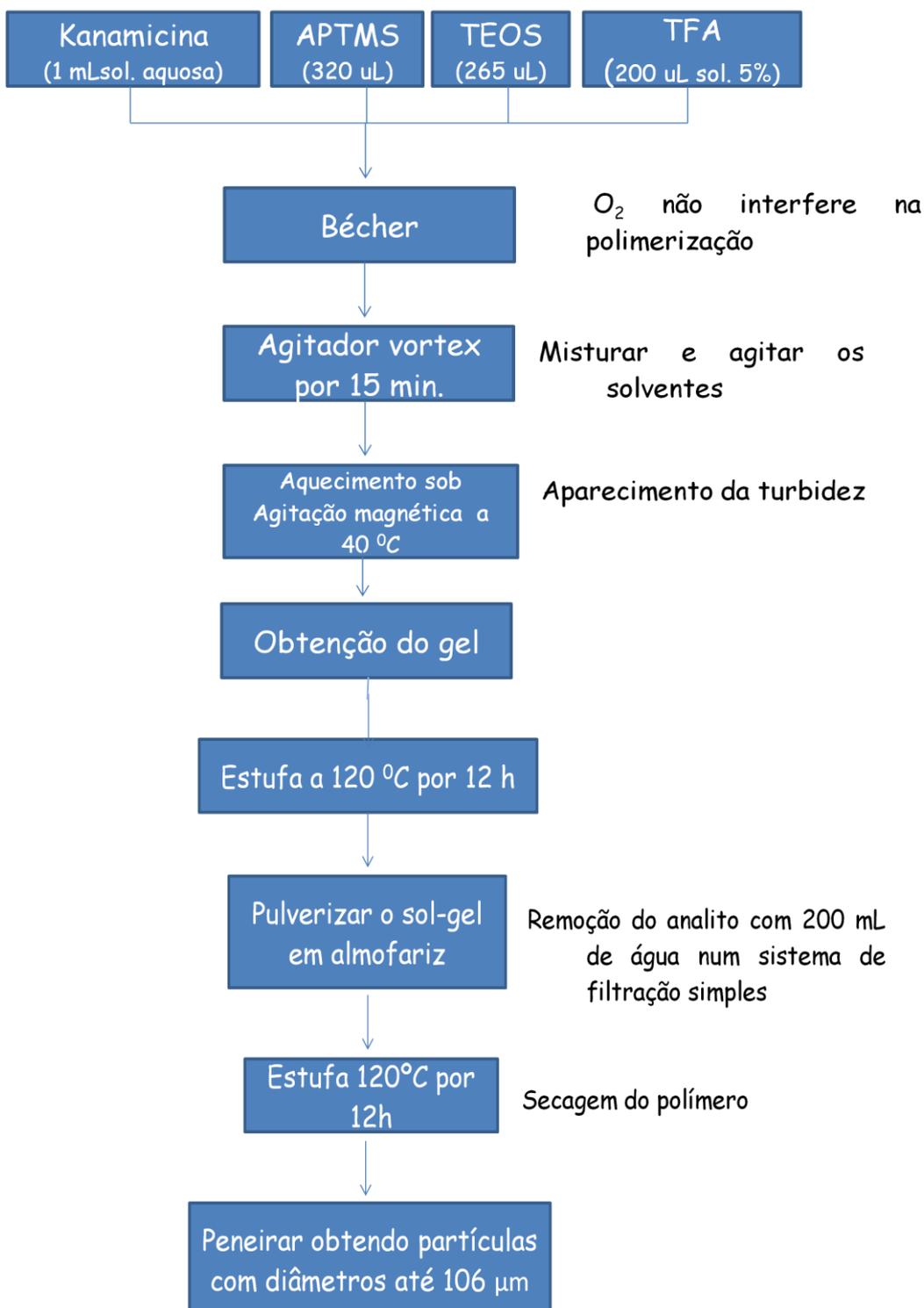


Figura 11 – Síntese do MIP-KANA (matriz sol-gel).

### 2.3.2.3. MIP-Piraclostrobina

O polímero impresso da PIRA, baseado no trabalho de Caro *et al.*, 2006 foi preparado pela abordagem de polimerização “in bulk” por interações não-covalentes. Uma massa de 0,1g (0,25 mmol) de PIRA foi dissolvidos no solvente acetona (3,3 ml) em uma ampola de vidro de 20,0 mL. Em seguida foram adicionados MAA 200  $\mu$ L (2,32 mmol), EGDMA 2,19 mL (23,20 mmol) e o AIBN, 1,21 mL (0,51 mmol).

A solução resultante foi desgaseificada sob fluxo de nitrogênio por 15 minutos. A ampola foi selada e a polimerização foi realizada termicamente em um banho-maria (a 60°C) por 24 h. Após este período, a ampola de vidro foi quebrada e o polímero foi pulverizado em um almofariz. A remoção do analito foi feita utilizando um aparelho extrator de soxhlet. Um cartucho de papel whatman contendo todo o polímero resultante da síntese foi colocado no aparelho. Foi utilizada uma mistura metanol ácido acético 9:1 %v/v como solvente extrator. Posteriormente o polímero foi seco a 60°C e então peneirado para obtenção de partículas de tamanhos regulares com diâmetros entre 53  $\mu$ m e 75  $\mu$ m, o mesmo foi estocado à temperatura ambiente. Um polímero não impresso NIP (sem adição de PIRA) foi preparado e tratado de forma idêntica à do MIP. Na Figura 12 podemos ver o fluxograma da síntese do MIP-PIRA.

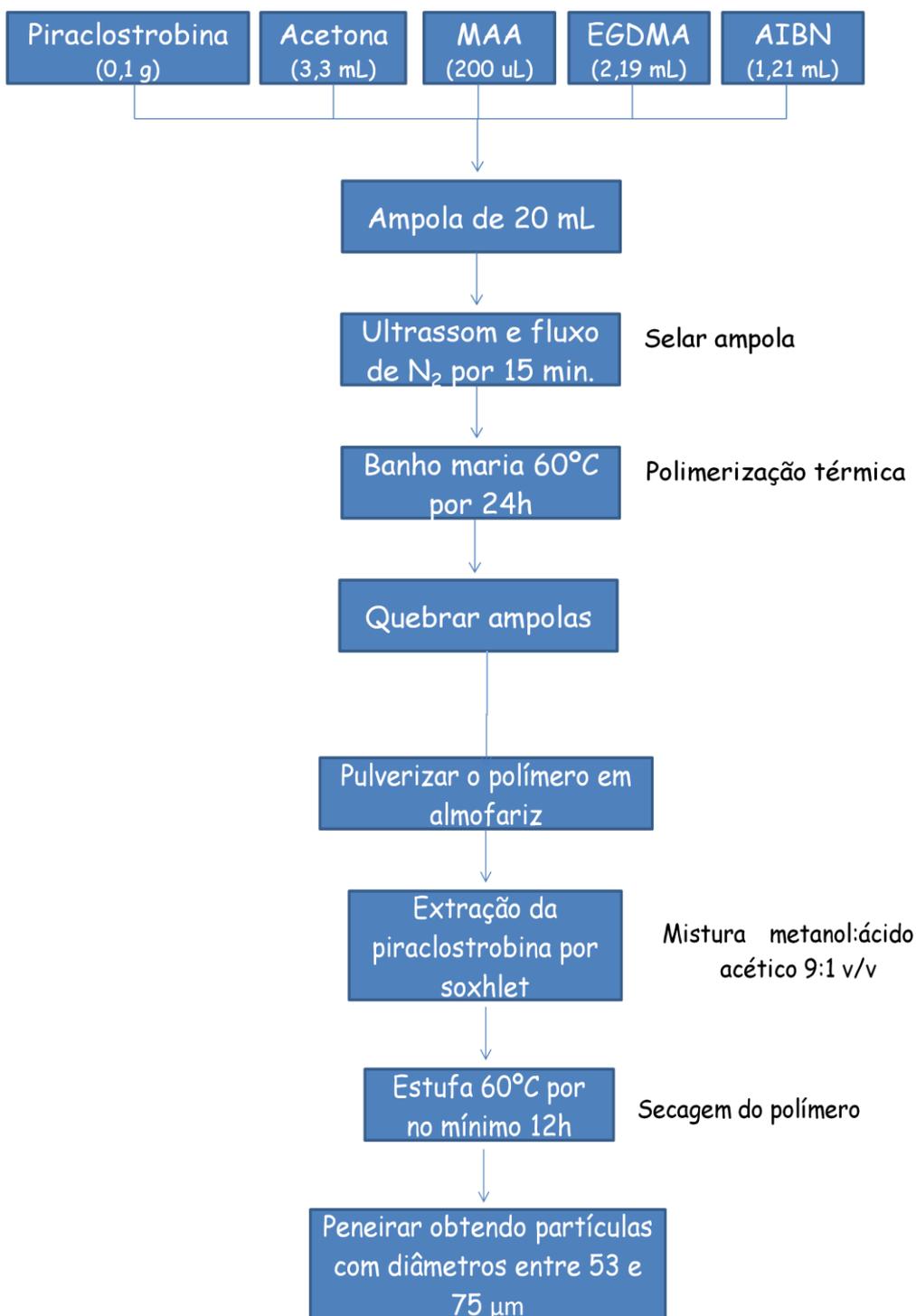


Figura 12 – Síntese do MIP-PIRA (matriz acrílica)

### 2.3.3.

#### Remoção dos resíduos de ácido acético dos polímeros

Após a síntese dos polímeros, foi feita a dessorção dos analitos e resíduos, a fim de eliminar interferentes que possam prejudicar as análises. Para os MIP-QUE, e MIP-PIRA, a dessorção foi feita em Soxhlet por 24 horas em presença de metanol: ácido acético 9:1 %v/v. O ácido acético é recomendado para aumentar a polaridade da mistura extratora, melhorando assim a eficiência da limpeza, por isso não se utilizou somente metanol, mesmo considerando-se que ele já apresenta uma polaridade característica pela presença do grupamento OH. Após a remoção dos analitos os polímeros foram secos em estufa, e para garantir a eliminação completa de resíduo de ácido acético foi feita filtração (lavagem) em funil simples com aproximadamente 30,0 mL de metanol. Para assegurar que não haviam interferentes nas matrizes poliméricas, os últimos 5,0 mL de cada filtração foram monitorados em espectrofotometria de absorção e espectrofluorimetria.

Uma vez que a Kana não possui fluorescência natural utilizou-se a sonda fluorescence CdTe-TGA QDs como sensor, uma vez que é possível obter linearidade com o aumento da concentração de kanamicina. A excitação da sonda foi feita em 350 nm e emissão foi coletada em 522 nm. No procedimento utilizou-se um volume total de 200,0 mL de água ultrapurificada.

### 2.3.4.

#### Síntese do CdTe-TGA QDs

Os pontos quânticos de CdTe foram sintetizados de acordo com os procedimentos descritos na literatura com ligeiras modificações (Liang, et al. 2006). Resumidamente,  $1,75 \times 10^{-4}$  mol de  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $3,8 \times 10^{-4}$  mol de TGA e 50,0 mL de água ultrapurificada foram adicionados a um balão de fundo redondo de 100,0 mL. O pH da mistura foi ajustado para 10,0 pela adição gota a gota de uma solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , sob agitação magnética. Em seguida uma das saídas do balão foi adaptada a um condensador, a outra foi necessária para colocar uma sonda de temperatura e a última foi utilizada para recolher alíquotas do material sintetizado com auxílio de agulha e seringa de plástico. Foi passado pelo sistema um fluxo de nitrogênio (mantendo-se agitação magnética) por aproximadamente meia hora a fim de eliminar completamente o oxigênio presente na aparelhagem.

Em seguida, 2,0 mL de uma solução de NaHTe preparado recentemente (obtido a partir da redução de telúrio em pó por  $\text{NaBH}_4$ , a 50 °C, em solução aquosa) foi injetado no sistema mantendo-se agitação magnética. O sistema permaneceu sob atmosfera de nitrogênio e aquecido a 90 °C (refluxo) por aproximadamente 20 min.

### **2.3.5. Avaliação dos polímeros**

#### **2.3.5.1. MIP-Quercetina**

Os monitoramentos individuais dos flavonóides (quercetina, naringenina e flavona) nas alíquotas recolhidas do MIP foram acompanhados por medições em espectrofotometria de absorção e na sonda fluorescente BSA (somente a QUE). As determinações cromatográficas da mistura dos flavonóides após eluição foram monitoradas e quantificadas por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD). Da mesma forma, o NIP foi avaliado em condições idênticas. Utilizou-se também a sonda analítica BSA em testes de reconhecimento para QUE nos cartuchos MIP e NIP e em amostras de urina.

##### **2.3.5.1.1. Acondicionamento das colunas MIP e NIP**

Quantidades de 300,0 mg de MIP e NIP foram empacotadas em seringas de 1,0 mL acopladas à filtros PURADISC com membrana de polietileno poroso de 0,45  $\mu\text{m}$ . Antes de cada utilização, as colunas foram condicionadas com ACN. O MeOH foi o solvente aplicado para a limpeza do polímero ao final de cada ciclo, o que possibilitou a reutilização dos cartuchos diversas vezes. As eluições foram feitas com auxílio de um pressurizador de ar.

As condições de aplicação do MIP com o analito de interesse (QUE) foram estudadas para avaliar a eficácia da técnica de extração. Testes de eluição com MeOH, ACN e DCM foram realizados em cartuchos contendo 300,0 mg de MIP e 20,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de QUE. Em cada cartucho, adicionaram-se 2,0 mL de solvente orgânico, as frações eluídas foram avolumadas em balão volumétrico de 5,0 mL e as medições foram feitas em espectrofotometria de absorção.

### 2.3.5.1.2.

#### Procedimentos e determinações espectrofotométricas, espectrofluorimétricas e cromatográficas

Para avaliar o reconhecimento do analito de interesse e dos demais flavonóides foram adicionadas alíquotas de 20,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de cada flavonóide aos cartuchos MIP e NIP. A eluição de cada cartucho foi feita com ACN. Frações de 1,0 mL provenientes de cada cartucho foram recolhidas separadamente em balões volumétricos de 5,0 mL. Os respectivos balões foram avolumados com o mesmo solvente da eluição (ACN).

Em seguida as frações foram lidas em um espectrofotômetro (conteúdo referente a balões de 5,0 mL) e através da sonda fluorescente BSA. Fizeram-se também análises em um cromatógrafo líquido com detecção por fotometria de absorção (DAD) a fim de validar o reconhecimento. Nas determinações cromatográficas a fase móvel foi constituída pelos seguintes solventes: i) solvente A (MeOH:ACN) 90:10 % (v/v) e ii) solvente B (água ultrapurificada:ácido acético) 99:1 % (v/v). A separação foi feita com fluxo constante de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$  à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e com o seguinte gradiente de eluição: (i) inicialmente 75% do solvente B, (ii) 75–30% em 25 min., (iii) 30-20% em 4 min., (iv) 20-5% em 2 min. e (v) retorno para condição inicial (75% do solvente B) em 2 min., totalizando um tempo total de corrida de 33 min. O detector utilizado foi o de arranjo de diodos em 254 nm (método adaptado de Lianda, 2009).

Nas determinações espectrofluorimétricas de QUE foi utilizado como sonda fluorescente a BSA. Em uma cubeta de quartzo de 4,0 mL foram adicionados 5,0  $\mu\text{L}$  da solução estoque de BSA  $50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e 2,5 mL de tampão fosfato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,9). Esta solução foi titulada com adição de alíquotas de 5,0  $\mu\text{L}$  a 100,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de quercetina ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). A intensidade de fluorescência foi medida a 280/345 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) com 10,0 nm de banda espectral e 1500 nm de velocidade de varredura. A aplicabilidade foi avaliada em amostras de urina para determinação de quercetina.

O preparo das amostras de suplemento alimentar e urina (fortificadas com quercetina) estão descritas no item 2.3.1.1.

Para a determinação de quercetina em amostras de suplemento alimentar alíquotas de 20,0  $\mu\text{L}$  da solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (preparadas a partir do suplemento) foram adicionadas aos cartuchos MIP. A quercetina presente no cartucho foi eluída com 7,0 mL de ACN e cada fração de 1,0 mL recolhida foi avolumada em balão volumétrico de 5,0 mL com ACN. As frações foram lidas em espectrofotômetro e em cromatógrafo.

Todo o conteúdo de urina fortificada foi passada pelo cartucho MIP e em seguida foram passados pela coluna MIP 5,0 mL de água ultrapurificada a fim de eliminar completamente as impurezas presentes na matriz de urina. A quercetina presente no cartucho foi eluída com 4,0 mL de MeOH em uma única fração. Essa fração foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e sua reconstituição foi feita em balão volumétrico de 5,0 mL com ACN. O controle da amostra sem adição de quercetina (urina) foi preparado da mesma forma e as amostras foram lidas em espectrofotometria de absorção e em cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).

A medição da amostra de urina em sonda fluorescente foi feita da mesma forma.

#### **2.3.5.1.2.1.**

#### **Otimização das condições de medição: planejamento experimental**

O planejamento experimental consiste em um conjunto de ensaios estabelecidos com base em critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempos de análise e dos custos envolvidos. (Button,2012).

O planejamento composto central (PCC) permite amostrar um conjunto de pontos que ao serem analisados em conjunto, permitam a construção de uma superfície de resposta em função da variação dos fatores experimentais. A associação do planejamento fatorial com a técnica de superfície de resposta torna possível propor um modelo matemático que relacione a resposta em função das variáveis estudadas, determinando assim a faixa ótima para a obtenção da melhor resposta analítica (Oliveira,2010). Neste trabalho foi adotado o planejamento Composto Central “CCD - Central Composite Design”, um dos tipos de planejamentos mais utilizados para ajustar modelos quadráticos. Neste desenho experimental, para se obter uma boa estimativa dos erros, um experimento é normalmente incluído no centro do planejamento com os respectivos valores médios dos níveis de todas as variáveis. Estes modelos experimentais no ponto central (nível zero) nos permitem avaliar a significância dos efeitos principais ou de interação, utilizando a metodologia de superfície de resposta. Ao mesmo tempo, se este tipo de experimento: (1) minimiza o risco de perda das relações não lineares entre fatores dependentes e independentes; (2) oferece a possibilidade

de estimação de um modelo razoável e (3) permite a verificação de sua possível falta de ajuste.

Nesta etapa do trabalho o objetivo foi construir modelos empíricos que permitam identificar as condições experimentais para se obter o maior valor das respectivas variáveis-resposta. Os coeficientes foram obtidos utilizando o método dos quadrados mínimos e o modelo foi avaliado empregando a análise de variância e a estimativa dos erros foi alcançada através de experimento no ponto central. Realizou-se o planejamento experimental  $2^2$  composto central para definir as condições experimentais para as medidas de fluorescência total da BSA.

Existem dois fatores que afetam a estabilidade da proteína: pH e força iônica. O pH afeta a estabilidade da proteína, pois aparentemente existe uma maior precipitação de proteínas a valores de pH próximos do seu ponto isoelétrico (PI). As proteínas com pH mais ácido revelam maiores afinidades a pH baixo e proteínas básicas a pH superior. A força iônica da solução é particularmente importante na determinação de qual tipo de interação é predominante. Sob pequena força iônica, aumentam as interações com o solvente, e as proteínas tendem a permanecer em solução. Sob forças iônicas maiores, a solubilidade das proteínas pode decrescer rapidamente.

Por isso os valores de pH e força iônica do tampão fosfato de sódio escolhidos foram considerados relevantes para otimizar ambas as medições. Cada parâmetro foi avaliado em níveis que correspondem à faixa dos valores experimentais (Tabela 4).

Utilizou-se o tratamento estatístico de otimização por restrição para sobrepor as superfícies de resposta aplicando a função “desejabilidade” (“desirability”) para mostrar as condições experimentais com maior emissão de fluorescência da proteína (controle) e sua condição de maior supressão na presença do analito. Isso foi feito já que a sensibilidade da curva de supressão de fluorescência depende da razão entre ambas as medidas ( $F_0/F$ ).

O objetivo foi gerar modelos matemáticos que permitissem identificar as melhores condições experimentais para a resposta de supressão de fluorescência da BSA na presença de quercetina. Para a elaboração de um método simples, os modelos matemáticos gerados procuraram envolver variáveis de simples operação porém significativas. A intenção não foi alcançar um modelo preditivo, mas obter um modelo simples e eficiente. O planejamento também tem o objetivo verificar a robustez do método em sua faixa de trabalho.

A Tabela 4 mostra um total de 24 experimentos realizados de modo aleatório, realizados após a montagem da matriz do planejamento.

Tabela 4- Matriz elaborada para o planejamento dos experimentos.

Variáveis originais	Variáveis codificadas				
	- 1,41	-1	0	+ 1	+1,41
<b>pH</b>	5,6	5,42	7,4	9,37	8,4
<b>Força iônica (M)</b>	0,02	0,009	0,045	0,08	0,07

O programa utilizado para se efetuar o planejamento completo dos dados bem como os cálculos foi o módulo “Experimental Design” do programa de estatística Statistica 6.0 Statsoft. Para o modelo estatístico o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi o erro puro.

i) Estudos preliminares: Efeito filtro interno

O efeito filtro interno refere-se à absorção da radiação de excitação (pré-filtro) e/ou a absorção da emissão de um fluoróforo (pós-filtro) causando a diminuição de sua radiação detectada. Esse efeito gera uma diminuição do sinal fluorescente por conta da presença de substâncias com capacidade para absorver uma significativa quantidade de radiação incidente de excitação da sonda ou emitida pela sonda. Esta diminuição da fluorescência (que aumenta com a concentração da substância absorvente) induz à superestimação do valor da constante de supressão, também chamada de constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ). A ocorrência deste efeito prejudica a robustez de métodos analíticos baseados no princípio de supressão.

Para contornar esse problema e efetivamente medir a queda de sinal causada pela atenuação estática ou dinâmica da sonda pela presença do analito, a abordagem mais simples é feita pela correção do efeito filtro. Isto é feito pela medição da absorvância, no comprimento de onda escolhido para excitação da sonda e no escolhido para medir sua emissão assim como a absorvância do da analito nas respectivas concentrações empregada nos ensaios. Em seguida, aplicam-se esses valores de absorvância na Equação 5 para correção da intensidade de fluorescência.

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \text{ antilog } (Abs_{\text{exc}} + Abs_{\text{em}})/2 \quad (5)$$

Onde  $F_{\text{corr}}$  é o valor corrigido de fluorescência, a  $F_{\text{obs}}$  é o valor medido de fluorescência,  $Abs_{(\text{exc})}$  é a absorvância no comprimento de onda de excitação, e  $Abs_{(\text{em})}$  é a absorvância no comprimento de onda de emissão.

A eliminação do efeito filtro torna a medida independente destes parâmetros de absorção do ligante. Ao mesmo tempo, esta correção depende das condições operacionais da medição de fluorescência. Várias abordagens de correção do efeito filtro foram propostas para atender diferentes condições experimentais nos estudos de eventos de supressão de fluorescência. Entretanto, a melhor maneira de eliminar a interferência desse efeito é assegurar que sua contribuição seja mínima, devendo-se procurar faixas de supressão sem a ocorrência de filtro. Nesse caso, recomenda-se que as concentrações devem ser escolhidas de forma que a absorvância do ligante adicionado seja inferior a 0,02 nos  $\lambda_{\text{exc}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$  para não ser necessário corrigir as constantes de Stern-volmer ( $K_{\text{SV}}$ ). Tal procedimento, às vezes requer que os valores escolhidos para  $\lambda_{\text{exc}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$  sejam diferentes dos valores máximos da sonda de modo a operar fora das bandas de absorção dos ligantes. Essa escolha sacrifica sensibilidade em favor de seletividade.

### **2.3.5.2. MIP-Kanamicina**

O trabalho foi dividido em três etapas distintas. A primeira etapa foi avaliar a seletividade do MIP/NIP frente a KANA, a segunda etapa consistiu na avaliação da vacina (contra febre amarela), que contém kanamicina, gelatina, glutamato de sódio, sorbitol, eritromicina e sacarose. A terceira etapa consistiu na avaliação de kanamicina em amostras de urina. O monitoramento e quantificação da kanamicina e da gelatina nas alíquotas recolhidas nos cartuchos MIP foram feitos em espectrofluorimetria utilizando CdTe-TGA QDs como sonda fluorescente. Da mesma forma, o NIP foi avaliado em condições idênticas.

### 2.3.5.2.1. Acondicionamento da coluna MIP e NIP

Quantidades de 300 mg de MIP e NIP foram empacotados em seringas de 1 mL acoplados à filtros PURADISC com membrana de polietileno poroso de 0,45 µm. Antes de cada utilização, as colunas foram condicionadas com água. Água ultrapurificada também foi utilizada como solvente de limpeza ao final de cada ciclo. As eluições foram feitas com auxílio de um pressurizador de ar.

### 2.3.5.2.2. Procedimentos e determinações luminescentes

Inicialmente, fez-se a otimização dos QDs a partir dos seguintes parâmetros: (i) Efeito do pH; (ii) Estabilidade da nanopartícula, (III) Efeito da variação do sinal do QDs em presença de KANA; (IV) Estudo dos interferentes e quantificação.

Para a construção da curva analítica da kanamicina foram adicionados em uma cubeta de quartzo 25,0 µL de uma dispersão estoque de CdTe-TGA QDs, 2,0 mL de água ultrapurificada e 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 8,0. Esta dispersão foi titulada com alíquotas de 10,0 a 710,0 µL de uma solução 1,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de kanamicina. A curva analítica de gelatina foi obtida da mesma maneira, contudo os volumes das alíquotas adicionadas foram de 5,0 a 235,0 µL de uma dispersão estoque 2,0 x 10<sup>-4</sup> g mL<sup>-1</sup> (de gelatina).

Os cartuchos MIP/NIP (previamente condicionados) foram carregados com alíquotas individuais de 10,0; 50,0 e 100,0 µL de uma solução estoque de Kanamicina 1,0 x 10<sup>-5</sup> g mL<sup>-1</sup>. As eluições (frações) foram feitas com até 6,0 mL de água. A quantificação de cada mL recolhido foi feita através sonda sonda CdTe-TGA QDs.

O mesmo procedimento foi feito para a gelatina a partir de uma solução estoque 2,0 x 10<sup>-4</sup> g mL<sup>-1</sup>. A intensidade de fluorescência foi medida a 350/522 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) com 6,0 nm de banda espectral e 1500 nm min<sup>-1</sup> de velocidade de varredura.

Testes com a mistura de KANA e gelatina foram feitos nos cartuchos MIP com adição de alíquotas de 50,0 µL de solução contendo 1,0 x 10<sup>-5</sup> g/mL de Kana e 2,0 x 10<sup>-4</sup> g/mL de gelatina. O procedimento para as medições foram os mesmos dos testes individuais.

O preparo das amostras de vacina e urina (fortificadas com Kanamicina) está descritas no item 2.3.1.1. A aplicabilidade do método foi avaliada em amostras de vacina da febre amarela contida de 5,0 mL no total (10 doses).

Desta amostra foram retiradas alíquotas de 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{L}$ , estas alíquotas foram avolumadas para 3,0 mL com água ultrapurificada e em seguida foram adicionados aos cartuchos MIP 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{L}$  respectivamente (a diluição foi necessária devido a elevada quantidade de gelatina na vacina). As eluições foram feitas conforme mencionado acima. A quantificação de cada mL recolhido foi feita através da sonda CdTe-TGA QDs.

As amostras de urina fortificadas com 10,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de Kanamicina  $1,0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$  foram adicionadas aos cartuchos MIP (previamente condicionados), em seguida foi feita uma eluição com 2,0 mL de água (a água foi descartada). Posteriormente foram adicionados 4,0 mL de água aos cartuchos e as frações de 1,0 mL foram recolhidas e levadas a condição de medição em espectrofluorímetro.

### **2.3.5.3. MIP-Piraclostrobina**

Este trabalho foi dividido em duas etapas distintas. A primeira etapa foi avaliar a seletividade do MIP/NIP frente aos pesticidas AZO, KRESO, TRI, FLU, PIRA, PICO e DIMO. A segunda etapa consistiu-se na avaliação de amostras de urina e água de rio enriquecidas com PIRA. O monitoramento e a quantificação da PIRA nas alíquotas recolhidas (MIP/NIP) foram feitos em espectrofluorímetro a 274/355 nm ( $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ ).

#### **2.3.5.3.1. Acondicionamento da coluna MIP e NIP**

Quantidades de 300,0 mg de MIP e NIP foram empacotadas em seringas de 1,0 mL acoplados a filtros PURADISC com membrana de polietileno poroso de 0,45  $\mu\text{m}$ . Antes de cada utilização, as colunas foram condicionadas com DCM. O MeOH foi o solvente aplicado para a limpeza do polímero ao final de cada ciclo. As eluições foram feitas com auxílio de um pressurizador de ar.

#### **2.3.5.3.2. Procedimentos, determinações luminescentes em espectrofluorímetro e determinações em HPLC**

As curvas analíticas dos pesticidas obtidas em metanol:água 20:80 % (v/v) na faixa de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Para determinações espectrofluorimétricas, a faixa de  $2,2 \times 10^{-9}$  a  $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  foi necessária para

determinações por cromatografia líquida com detecção por fluorimetria. (ver as faixas) A faixa de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> foi requerida para as determinações por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) do analito PIRA. Para as determinações por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD), para a AZO a faixa foi de  $2,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; para a KRESO foi de  $4,0 \times 10^{-8}$  a  $7,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; e para a FLU, DIMO, TRI e PICO foi de  $2,0 \times 10^{-8}$  a  $7,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. As medições por espectrofluorimetria de PIRA e AZO foram feitas a 274/335 nm.

A primeira etapa de reconhecimento e seletividade dos cartuchos MIP/NIP foi feita para os pesticidas azoxistrobina e PIRA, com quantificação espectrofluorimétrica. Foram adicionados aos cartuchos MIP/NIP 20,0 uL de uma solução estoque de piraclotrobina  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e 25,0 uL de uma solução estoque de azoxistrobina  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Frações de 1,0 mL provenientes de cada cartucho foram recolhidas separadamente em balões volumétricos de 5,0 mL. O DCM foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, e então o conteúdo de cada balão foi levado a condição de trabalho.

Na segunda etapa foi avaliado o reconhecimento e a seletividade dos cartuchos MIP/NIP frente a todos os pesticidas, com detecção por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD). Os cartuchos MIP/NIP foram carregados da mesma maneira descrita na primeira etapa com 10,0 µL de uma solução  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de PIRA e 30,0 µL de uma solução  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> para os demais pesticidas.

Alíquotas de 20,0 µL recolhidas das frações de 1,0 mL provenientes das eluições dos cartuchos MIP/NIP, foram injetadas no HPLC (absorção a 220 nm). Curvas analíticas de padrões de pesticidas também foram obtidos no HPLC. O método utilizado para determinação e quantificação em HPLC foi adaptado de Sundravadana *et al.*, 2008. A fase móvel consistiu-se de uma mistura de água:ACN 40:60 % (v/v), (isocrático).

Na terceira etapa foi avaliada a mistura dos pesticidas por HPLC com detecção por fluorimetria e DAD. Alíquotas de 15,0 µL de uma solução  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> foram injetados nos cartuchos e as medições das alíquotas foram feitas conforme mencionado nas etapas anteriores.

O preparo das amostras de urina e água de rio fortificadas com PIRA estão descritas no item 2.3.1.1.

Para determinação de PIRA em urina foram passados 5,0 mL de MeOH na coluna MIP para garantir a limpeza, em seguida 3,0 mL de água foram adicionadas à coluna para condicionar o cartucho. As amostras foram adicionadas

aos cartuchos MIP e as eluições feitas passando-se pelo cartucho 5,0 mL de água ultrapurificada a fim de eliminar as impurezas presentes na matriz de urina. A eluição completa da PIRA foi feita com adição de até 9,0 mL de DCM aos cartuchos MIP. O mesmo procedimento foi feito para o ensaio do controle da urina. Finalmente as amostras foram lidas em espectrofluorímetro e em cromatógrafo.

Para a determinação de PIRA em água de rio, utilizou-se o conteúdo de amostras presentes em balões volumétricos de 50,0 mL. As amostras foram passadas pelas colunas MIP e após eluição a água (50,0 mL) foi descartada. Em seguida, para garantir que toda a PIRA seja recuperada das colunas MIP, foram adicionados 9,0 mL de DCM em cada cartucho (estes foram recolhidos em balão de 10,0 mL). O conteúdo de cada balão foi levado a secar sob fluxo de nitrogênio, e a fração foi reconstituída em balão volumétrico de 5,0 mL (condição de medição), as medições foram feitas em espectrofluorimetria e em HPLC.

#### **2.4. Validação de método analítico**

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia a Validação pode ser definida como uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (JCGM 200:2008). A avaliação dos parâmetros de validação possibilita a determinação das características de desempenho de um método analítico (INMETRO, 2011a).

Os métodos que devem ser validados são: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; métodos normalizados que sofreram ampliações e modificações (INMETRO, 2011d). Tanto a Anvisa quanto o Inmetro publicaram guias para a validação de métodos analíticos (Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 07/2011). Estes documentos têm como objetivo auxiliar laboratórios na demonstração que um determinado método atende as características necessárias de modo a obter resultados com a qualidade requerida.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros de validação exigidos pelos órgãos nacionais INMETRO e ANVISA (INMETRO, 2011a; ANVISA, 2003a).

Tabela 5 - Parâmetros de validação indicados nos documentos da ANVISA (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003) e do INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de 07/2011) e realizados neste trabalho.

<i>INMETRO</i>	<i>ANVISA</i>
Seletividade	Especificidade e Seletividade
Linearidade	Linearidade
Faixa de trabalho e faixa linear	Intervalo
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetitividade (precisão intra-corrida)
Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Tendência/Recuperação	Exatidão

#### **2.4.1. Seletividade**

A seletividade pode ser definida como a capacidade que o método possui de medir um determinado composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz também chamados interferentes (ANVISA, 2003). A presença de interferentes pode aumentar ou reduzir o sinal do analito a ser determinado, sendo a magnitude do efeito dependente também da concentração (INMETRO, 2011a).

A seletividade pode ser avaliada de diversas formas, através da análise da pureza do sinal, análise de amostra de referência, comparação dos resultados obtidos em diferentes condições de medição, comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos de análise, análise da amostra sem a presença do analito de interesse, análise por método de adição de padrão e comparação da inclinação da reta obtida com a inclinação da curva de padrões (INMETRO, 2011a).

#### **2.4.2. Linearidade**

A linearidade pode ser definida como a habilidade do método em estudo gerar resultados proporcionais a concentração do analito na amostra (Eurachem, 1998). Pode ser representada pela equação da reta (Equação 6):

$$y = a + bx \quad (6)$$

onde,

$y$  = resposta medida (absorvância, altura ou área do pico, etc.);

$x$  = concentração;

$a$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ;

$b$  = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Segundo o documento DOQ-CGCRE-008, a determinação da linearidade deve ser feita a partir da construção de uma curva analítica com no mínimo cinco níveis de concentração, sendo três o número mínimo de replicatas. A linearidade da resposta analítica de um método deve ser avaliada por meio do coeficiente de correlação linear (INMETRO, 2011), sendo o valor mínimo aceitável igual a 0,99 (ANVISA, 2003a). Entretanto, o mesmo documento também destaca que é necessário avaliar a homogeneidade das variáveis, avaliando os resíduos. Isso pode ser feito por meio de alguns testes estatísticos (teste  $t$  de *Student*, a prova  $F$  de Fischer, entre outros).

### **2.4.3. Faixa de trabalho e faixa linear**

A faixa de trabalho pode ser definida como a faixa de concentração do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado, cujo limite inferior é o valor do limite de quantificação e o limite superior depende das características do equipamento de medição. É derivado do estudo da linearidade e depende da aplicação pretendida do método (INMETRO, 2011a; ANVISA, 2003a).

A determinação da faixa de trabalho pode ser feita através de três etapas. Na primeira etapa analisa-se um controle de reagentes com adições de concentrações variadas do analito ou controle da amostra com adições de concentrações variadas do analito ou ainda amostras de referência em diferentes níveis de concentração. A partir dos resultados obtidos constrói-se um gráfico de concentração  $x$  resposta, identificando-se inicialmente a faixa linear e os limites de detecção e quantificação. Na segunda etapa deve ser realizada análise do controle da amostra com adições variadas do analito na faixa linear, com objetivo de confirmar a linearidade. A terceira etapa consiste na determinação dos limites de detecção e quantificação através da análise da amostra com adições variadas do analito próximas ao limite de detecção (INMETRO, 2011a). Já a faixa linear,

contida na faixa de trabalho, é a faixa na qual o método apresenta linearidade (INMETRO, 2011a).

#### 2.4.4. Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como sendo o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método, porém não necessariamente quantificado (INMETRO, 2011a; ANVISA, 2003a).

A determinação do limite de detecção é realizada por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. É obtido a partir da análise do branco da amostra ou do branco da amostra adicionado da menor concentração aceitável do analito. O DOQ-CGCRE-008 do Inmetro recomenda a realização de no mínimo sete replicatas para a determinação do LOD. Assim, o LOD pode ser dado pela média dos valores do branco da amostra mais três vezes o desvio padrão dos resultados obtidos (INMETRO, 2011a; ANVISA, 2003a).

O LOD, obtido por meio da análise de sete soluções contendo a menor concentração dos analitos que se consegue visualmente observar no cromatograma, foi calculado por meio da Equação 7. Nas determinações por espectrofotômetro, o cálculo foi baseado na Equação 8 obtido por meio da análise de sete soluções do ensaio em branco. O método de obtenção do s, a partir das soluções contendo as menores concentrações dos analitos foi adotado devido à dificuldade de medição de um sinal de branco (o sinal do branco é praticamente zero).

$$LOD = x_b + 3s \quad (7)$$

$$LOD = \frac{3 \times s_b}{a} \quad (8)$$

onde  $x_b$  é a média dos valores medidos para os brancos,  $s$  é o desvio padrão das sete medições da menor concentração do analito ( $s$ ) e do ensaio em branco ( $s_b$ ) e  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica.

### 2.4.5. Limite de quantificação

De acordo com definição da Anvisa (2003a) o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais especificadas. É normalmente o menor ponto na curva de calibração.

Assim como no limite de detecção a determinação do LOQ pode ser realizada através dos dados dos desvios padrão obtidos nas análises do ensaio em branco da amostra ou do ensaio do branco da amostra adicionado de concentrações variadas do analito próximas ao LOD. No entanto, enquanto que para o cálculo do LOD o fator de multiplicação é 3, para o cálculo de LOQ este fator deve ser alterado para 5, 6 ou 10 de acordo com a incerteza desejada (INMETRO, 2011a).

O LOQ foi realizado de modo semelhante à determinação do LOD, utilizando-se, no entanto a Equação 9. Nas determinações por espectrofotômetro, o cálculo foi baseado na Equação 10 obtido por meio da análise de sete soluções do ensaio em branco.

$$LOQ = x_b + 10s \quad (9)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s_b}{a} \quad (10)$$

### 2.4.6. Tendência/recuperação

Segundo o DOQ-CGCRE 008, exatidão de um método analítico é avaliada numericamente através da tendência, a qual pode ser avaliada utilizando-se os seguintes processos: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011a).

Sempre que possível, deve-se utilizar MRC na validação de um método de ensaio. Logo para avaliar a exatidão comparam-se os resultados obtidos pelo laboratório da amostra padrão com os valores certificados do material de referência, fornecidos por laboratório acreditado (INMETRO, 2011d).

O percentual de recuperação do analito pode ser definido como a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada

com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada. Segundo o DOC-CGCRE008, para a avaliação da recuperação, pode-se utilizar amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) em três níveis de concentração: baixo, médio e alto, de acordo com a faixa de trabalho do método (INMETRO, 2011a).

O cálculo para obtenção da recuperação analítica foi realizado conforme Equação 11.

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{valor}_{\text{observado}}}{\text{valor}_{\text{esperado}}} \times 100 \quad (11)$$

#### **2.4.7. Precisão**

Segundo o VIM 2009, precisão de medição é definida como sendo o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.

Pode ser expressa pelo desvio padrão ou coeficiente de variação, sendo considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2011a).

##### **2.4.7.1. Repetitividade**

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições de um mesmo método, dentro de um curto período de tempo, efetuadas sob as mesmas condições de medição, as quais incluem: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento utilizado sob as mesmas condições e mesmo local (INMETRO, 2011a).

A repetitividade foi calculada pelo cálculo do desvio padrão relativo (%CV) indicado na Equação 12.

$$CV(\%) = RSD = \frac{s_r}{M_{\text{medição}}} \times 100 \quad (12)$$

onde  $s_r$  é a estimativa do desvio padrão,  $M_{\text{medição}}$  é a média das determinações.

#### **2.4.8. Comparação da precisão entre métodos**

A comparação da precisão entre métodos possibilita verificar o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, e é realizada por meio de análises sobre a mesma amostra em separado, utilizando o método desenvolvido e o método de referência (INMETRO, 2011a). Neste trabalho foi aplicado o teste t Student e feita à comparação entre as médias em uma concentração ao longo da faixa de trabalho.