

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

FLÁVIA REGINA DOS SANTOS

**MÉTODO DE LOWRY: VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DO
CÁLCULO DA INCERTEZA**

Araraquara

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**MÉTODO DE LOWRY: VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DO
CÁLCULO DA INCERTEZA**

FLÁVIA REGINA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Paschoal Batistuti

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Santos, Flávia Regina dos
S337m Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza / Flávia
Regina dos Santos. – Araraquara, 2012
63 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: José Paschoal Batistuti

1. Proteína. 2. Validação. 3. Lowry. 4. Incerteza do método. I. Batistuti,
José Paschoal, orient.. II. Título.

CAPES: 50700006

MÉTODO DE LOWRY: VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DO CÁLCULO DA INCERTEZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Ciência dos Alimentos.

Pós-graduanda: Flávia Regina dos Santos

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti
(Orientador)

Prof. Dr. Rubens Monti
(Membro titular)

Profa. Dra. Alice Yoshiko Tanaka
(Membro titular)

DEDICO

A Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paschoal pela oportunidade, incentivo e confiança para a execução deste trabalho, sempre me confortando com palavras, disposto a ajudar e presente nas práticas do trabalho abrindo mão de finais de semana e feriados com a família;

Ao Professor Dr. Fernando Fertoni por se dispor a me ajudar com os cálculos estatísticos;

Agradeço aos meus pais e minha irmã pelo incentivo e paciência nos momentos em que eu mais precisei;

Aos amigos de longa data por sempre me apoiarem e incentivarem com uma palavra amiga ou um simples bate-papo;

Aos professores do DAN pelo aprendizado;

Aos amigos do DAN pela amizade, companheirismo nas disciplinas, conversas de boteco, piqueniques, congressos, desabafos;

Às técnicas dos laboratórios Lica e Mara e em especial à Dri que me ensinou muito, além de uma grande amiga muitas vezes foi mãezona;

Às secretárias da Pós e ao pessoal da Biblioteca por sempre estarem prontos para ajudar;

Ao pessoal da portaria e da limpeza por estarem sempre com um sorriso no rosto pelos corredores;

À Cristina pela oportunidade e à Luciana, Valdez e Robson pelas conversas e paciência durante as análises.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. OBJETIVOS.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Proteínas	15
2.2. Validação de métodos analíticos	19
2.2.1. Definições.....	19
2.2.2. Quando validar um método	20
2.2.3. Plano de Validação	22
2.2.4. Parâmetros utilizados na validação de métodos	24
2.2.4.1. Curva de calibração/ Linearidade.....	24
2.2.4.2. Faixa Linear de Trabalho.....	24
2.2.4.3. Especificidade/Seletividade.....	25
2.2.4.4. Exatidão.....	25
2.2.4.5. Precisão.....	25
2.2.4.6. Precisão intermediária	26
2.2.4.7. Limite de Detecção (LD).....	26
2.2.4.8. Limite de Quantificação (LQ)	26
2.2.4.9. Robustez	27
2.2.4.10. Recuperação.....	27
2.2.4.11. Incerteza de medição	27
2.2.5. Espectrofotometria.....	29
2.2.6. Método de Lowry	33

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO II.....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Material.....	45
2.2. Métodos	45
2.2.1. Doseamento da proteína por espectroscopia do UV-Visível.....	45
2.2.2. Parâmetros avaliados	46
2.2.2.1. Linearidade	46
2.2.2.2. Faixa Linear de Trabalho.....	46
2.2.2.3. Precisão.....	47
2.2.2.4. Sensibilidade.....	47
2.2.2.5. Limite de Detecção	47
2.2.2.6. Limite de Quantificação	47
2.2.2.7. Robustez.....	48
2.2.2.8. Incerteza de medição	47
2.2.3. Análise Estatística	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Linearidade e Sensibilidade.....	48
3.2. Faixa Linear de Trabalho.....	51
3.3. Limite de Detecção.....	52
3.4. Limite de Quantificação	52
3.4. Precisão.....	53
3. 5. Robustez	54
3.6. Incerteza de medição	55

4. CONCLUSÕES	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
6. ANEXO I.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Determinação do diagrama de calibração da proteína BSA.	48
Figura 2: Avaliação da linearidade a partir da análise de resíduos ($Y - Y_0$), sendo Y_0 massa de BSA adicionada e Y a massa determinada.....	49
Figura 3: a) Diagrama de calibração da proteína BSA. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 10 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50
Figura 4: a) Diagrama de calibração da proteína BSA na faixa de concentração entre 20 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 20 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50
Figura 5: a) Diagrama de calibração da proteína BSA na faixa de concentração entre 50 e 102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 50 e 102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	51
Figura 6: Determinação da faixa linear de trabalho (limite inferior e superior) através da correlação $[\text{Resposta}/C] \times 100 \times \log C$	51
Figura 7: Limite de detecção da proteína BSA ($4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$).....	52
Figura 8: O limite (LQ) pode ser estabelecido em 20 ppm para uma incerteza na medição, menor que 3% ($u < 3\%$).	53
Figura 9: Repetitividade ($\pm s$) = $0,152 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 7 repetições, sendo o $n=11$ a média.	54
Figura 10: Precisão intermediária ($\pm sr$) = $0,450 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para K tabelado da norma ASTM E 691-99.	54
Figura 11: Diagrama de Ishikawa mostrando as causas e subcausas de fontes de erro.	56
Figura 12: Estimativa da incerteza da medição X concentração.	57
Figura 13: Incerteza combinada.	57
Figura 14: Incerteza combinada para concentração $10,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$	58

Figura 15: Incerteza combinada para concentração $51,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$	58
Figura 16: Incerteza combinada para concentração $102 \mu\text{g.mL}^{-1}$	59

RESUMO

As proteínas são de fundamental importância nos processos biológicos atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas entre outros, pois são essenciais sob os aspectos da estrutura e função celular. Tem se tornado cada vez mais relevante o estudo de metodologias para determinar proteínas em várias áreas como em tecnologia e ciência de alimentos, laboratórios de análises clínicas, nutrição animal e humana. Antes de iniciar qualquer tipo de análise de proteínas, o método utilizado deve ser validado, pois a validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. A validação é um processo dinâmico e constante que começa na fase de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e analistas continuando na fase de experimentos. Um processo de validação bem definido e documentado oferece as agências reguladoras evidências de que o método é adequado. As características investigadas no processo de validação a fim de demonstrar o desempenho do método são: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Limite de detecção, Limite de quantificação, Precisão, Exatidão, Precisão intermediária, Robustez, Especificidade, Incerteza de medição e Recuperação. Os métodos mais utilizados para quantificar proteínas são Biureto, Bradford, BCA, Kjeldahl e de Lowry, sendo o método de Lowry o mais utilizado. Devido aos interferentes e a incerteza do método em relação aos parâmetros analisados, este trabalho teve o propósito de realizar a validação do método de Lowry modificado quanto aos parâmetros preconizados pela NATA. A proteína utilizada em todo o experimento foi a albumina bovina sérica – BSA e a metodologia foi a original com algumas modificações. Apesar da existência de muitas técnicas modernas, o método espectrofotométrico tem demonstrado ser eficaz, além do custo mais baixo e de fácil manuseio. O método foi desenvolvido e validado.

Palavras chave: validação, espectroscopia, proteína

ABSTRACT

The proteins are of fundamental importance in biological processes acting as enzymes, hormones, neurotransmitters, transporters across membranes among others, as they are essential aspects in the structure and cellular function. It has become increasingly relevant the study of methodologies for determining proteins in various areas such as technology and food science, clinical laboratories, animal and human nutrition. Before starting any type of protein analysis, the method used must be validated because the method validation is a vital aspect of analytical quality assurance. Validation is a constant and dynamic process that begins at the stage of selection, development and optimization of the method and the qualification of tools, materials, analysts and continuing in the experimental phase. A validation process well defined and documented regulatory agencies provides evidence that the method is appropriate. The characteristics investigated in the validation process to demonstrate the performance of the method are: linearity, linear working range, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, precision intermediate, robustness, specificity, uncertainty of measurement and recovery. The methods used to quantify proteins are Biuret, Bradford, BCA, Kjeldahl, and Lowry, the method of Lowry the most used. Due to interferences and uncertainty regarding the method parameters, this study aimed to perform the validation Lowry's method modified the parameters recommended by NATA. The protein used throughout the experiment was to bovine serum albumin - BSA and was the original method with some modifications. Despite the existence of many modern techniques, the spectrophotometric method has been shown to be effective, in addition to lower cost and easy handling. The method was developed and validated.

Keywords: Validation; Spectroscopy; Protein

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são de fundamental importância nos processos biológicos atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas entre outros, pois são essenciais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Tem se tornado cada vez mais relevante o estudo de metodologias para determinar proteínas em várias áreas como em tecnologia e ciências de alimentos, laboratórios de análises clínicas, nutrição animal, nutrição humana e pesquisadores da área (ZAIA, 1998). A quantificação de proteínas é importante e comum a muitas aplicações na pesquisa bioquímica geral e em práticas de laboratório clínico. Nos últimos 20 anos houve um aumento de números de ensaios para determinar a concentração de proteínas (OKUTUCU, 2007). Antes de iniciar qualquer tipo de análise de proteínas, o método utilizado deve ser validado, pois segundo Barros (2002) a validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica.

Vários métodos têm sido descritos na literatura para quantificar proteínas baseados em espectrofotometria, nefelometria e, recentemente, medições HPLC. A escolha do método depende da composição e conformação da proteína. Cada método tem suas vantagens e desvantagens, muitas vezes é necessário obter mais de um tipo de análise de proteínas para a aplicação em pesquisas (OKUTUCU, 2007). É de suma importância que os laboratórios disponham de critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os ensaios que realizam produzem resultados confiáveis e adequados a qualidade pretendida (DOQ-CGCRE-008, 2010).

A validação garante que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis da amostra. É um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento e transferência da técnica, ou seja, é um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e analistas continuando na fase de experimentos e transferência do método (RIBANI, 2004; BARROS, 2002). No planejamento e execução da validação deve-se definir a

aplicação, objetivo e escopo do método além dos parâmetros da validação e critérios de aceitação; verificar se as características de desempenho dos equipamentos são compatíveis com os exigidos pelo método; qualificar padrões e reagentes; planejar os experimentos incluindo o tratamento estatístico e, por fim, fazer os experimentos de validação. A validação do método analítico permite demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido. Um método deve ser sempre validado quando ele não for normalizado, quando o método for desenvolvido pelo próprio laboratório, quando métodos normalizados forem usados fora dos escopos para os quais foram ensaiados e para ampliações e modificações de métodos normalizados (DOQ-CGCRE-008, 2010).

O procedimento analítico deve ser validado para cada substância como um todo e abrangendo toda a gama de concentrações da espécie requerida, já que a validação do método analisa a precisão dos resultados considerando os erros sistemáticos e aleatórios, sendo os erros sistemáticos piores do que os erros aleatórios (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007; MAROTO, 1999). Segundo Maroto (1999), ao verificar a precisão da medição, o analista gera informações sobre os diferentes intermediários, uma vez que estas estimativas têm sido obtidas por diferentes fatores que afetam os resultados, elas mostram as incertezas das diferentes etapas no processo analítico.

Um processo de validação bem definido e documentado oferece as agências reguladoras evidências de que o método é adequado para o uso desejado. Para atingir esse reconhecimento a nível internacional, requisitos legais de certificação e credenciamento devem ser observados. A documentação consiste de plano mestre, protocolo, planilhas de dados e relatório (BARROS, 2002). As características investigadas no processo de validação a fim de demonstrar o desempenho do método são: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Limite de detecção, Limite de quantificação, Precisão, Exatidão, Precisão intermediária, Robustez, Especificidade, Incerteza de medição e Recuperação. Um processo de validação de métodos bem definido e documentado oferece evidência de forma objetiva que o método analisado atende as especificações requeridas e é adequado ao uso desejado. Embora exista um consenso em relação às quais parâmetros devem ser avaliados, há grande diversidade de como esses experimentos são delineados observando-se recomendações contraditórias ou equivocadas, algumas vezes informações importantes são omitidas. Isto tem resultado em grande dificuldade por parte dos laboratórios, pois eles não dispõem de referências confiáveis de como proceder em determinados ensaios. O uso indiscriminado das

referências existentes pode representar importante fonte de erro nos processos de validação principalmente na área de análise de alimentos (SOUZA, 2007).

A validação deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e de sua execução. Correlacionando-se desenvolvimento, otimização e validação do método, um laboratório pode produzir resultados bastante eficientes e produtivos, pois a qualidade dos resultados gerados está diretamente relacionada com a qualidade deste processo (ABNT, 2005; Brasil 2003; Brasil 2005; EC. 2000; INMETRO 2003; ICH, 1995).

1.1. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Validar o método de Lowry modificado;
- Calcular a estimativa da incerteza.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e representam cerca de 50% do seu peso seco. São encontradas em todas as partes das células, pois são fundamentais na estrutura e funções celulares, além disso, a maior parte da informação genética é expressão pelas proteínas (LEHNINGER, 1976). Os aminoácidos podem ligar-se covalentemente por ligações peptídicas formando peptídeos e proteínas. Os polipeptídeos formam as proteínas e estes são formados por ligações peptídicas entre os grupos amino ($-NH_2$) de um aminoácido e carboxílico ($-COOH$) de outro, ambos ligados ao carbono α de cada um dos aminoácidos. (SGARBIERI, 1996).

As proteínas são formadas por átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, e quase todas contêm enxofre. Algumas ainda podem conter fósforo, ferro, zinco e cobre. Uma proteína pode se apresentar em diferentes graus de estruturação, podendo ser primária, secundária, terciária ou quaternária. Durante muito tempo acreditou-se que a função de uma proteína se dava pela sua estrutura tridimensional, no entanto, nos últimos anos, numerosas proteínas que não apresentam forma globular ou tridimensional foram identificadas possuindo função biológica (CAMPOS et al, 2011).

A célula geralmente contém milhares de diferentes proteínas e cada uma tem diferente atividade biológica (NELSON e COX, 2011). As proteínas apresentam muitas funções biológicas diversas. Elas são de fundamental importância nos processos biológicos atuando como catalisadores biológicos (enzimas), hormônios, proteínas de transporte, estrutural e contrátil, antígenos/anticorpo, função nutricional, neurotransmissores, transportadores através de membranas entre outros, pois são essenciais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. As enzimas representam a maior classe e cada uma delas catalisa um tipo diferente de reação química. A molécula enzimática contém um sítio ativo ao qual seu substrato específico está ligado durante o ciclo catalítico. Outra classe de proteínas tem a função de armazenar aminoácidos como nutrientes para o crescimento do embrião, como é o caso da ovoalbumina da clara do ovo e a gliadina das sementes do trigo. Outras proteínas tem a função de transporte, elas se ligam e transportam tipos específicos de moléculas no sangue. Outras ainda funcionam como elementos essenciais nos sistemas contrateis de motilidade, como é o

caso da actina e miosina. Elas podem ainda ter função protetora, hormonal, toxinas, elementos estruturais entre outras (SGARBIERI, 1996; LEHNINGER, 1976; ZAIA, 1998).

As proteínas desempenham um papel extremamente importante na determinação das propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos. Além disso, o valor biológico atribuído a presença de peptídeos bioativos nas suas sequências primárias faz com que as proteínas sejam consideradas ingredientes potenciais para a promoção da saúde (CARERI e MANGIA, 2003).

As proteínas não globulares são também conhecidas por proteínas não estruturadas ou desordenadas. Essa natureza é determinada pelas características físico-químicas da sua composição de aminoácidos, possui resíduos de glicina e alanina ao passo que falta triptofano e cisteína. Essas proteínas permanecem solúveis após tratamento térmico ou baixo pH, condições em que a maioria das proteínas globulares são desnaturadas e precipitam (CAMPOS et al, 2011).

As proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a sua composição: proteínas simples que apresentam apenas aminoácidos em sua composição e proteínas conjugadas que apresentam aminoácidos (parte protéica) e outras substâncias (parte não protéica) (SGARBIERI, 1996).

Os aminoácidos possuem 2 grupos ionizáveis, um grupo carboxílico ($-\text{COO}^-$) e um grupo amínico ($-\text{NH}_3^+$) no carbono. Desse comportamento ácido-básico deriva-se o conceito de ponto isoeletrônico (PI) que é o valor de pH em que as cargas positivas e negativas são iguais.

A solubilidade de uma proteína depende do número e arranjo de cargas na molécula, que por sua vez dependerá da composição em aminoácidos, particularmente dos resíduos ácidos e básicos, as partes não protéicas também influenciam a solubilidade. A solubilidade de uma proteína poderá ser influenciada também por fatores como pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura. As proteínas geralmente são mais solúveis ou em pH ácidos ou alcalinos por causa do excesso de cargas positivas ou negativas a esses pHs. O pH de menor solubilidade é o pI da proteína, pois neste estado as cargas positivas e negativas das moléculas são iguais. Portanto no pI a solubilidade está diminuída e tende a formar precipitados (SGARBIERI, 1996).

Nos últimos anos as técnicas e métodos para separação, purificação, quantificação e caracterização de proteínas e peptídeos tem sido desenvolvidas e aprimoradas. A investigação sobre a estrutura e propriedades físico-químicas das proteínas de alimentos tem sido essencial para a elucidação da sua estrutura molecular responsável pela sua funcionalidade nos alimentos. Além disso, o desenvolvimento de métodos para a purificação de proteínas tem sido de grande interesse na investigação biotecnológica (CARERI e MANGIA, 2003).

Tem se tornado cada vez mais relevante o estudo de metodologias para determinar proteínas em várias áreas como em tecnologia e ciências de alimentos, laboratórios de análises clínicas, nutrição animal, nutrição humana e pesquisadores da área (ZAIA, 1998).

Os métodos mais utilizados para quantificar proteínas baseiam-se em três princípios diferentes. O primeiro princípio é o de absorção de luz ultravioleta no comprimento de onda de aproximadamente 280 nm. O segundo princípio é baseado na reação de grupos ou sítios específicos da proteína com diversos reagentes originando complexos (cromóforos) que absorvem em diferentes faixas de comprimento de onda da luz visível e o terceiro princípio baseia-se na determinação de nitrogênio seguido pela multiplicação de um fator de conversão de porcentagem de nitrogênio em porcentagem de proteína (SGARBIERI, 1996).

O método que quantifica através do nitrogênio é o método de Kjeldahl. Os métodos colorimétricos podem ser: Reação de biureto, método de Lowry (que é um método espectrofotométrico) e complexação com corantes.

As proteínas são cadeias polipeptídicas longas, podendo conter de 100 a milhares de resíduos de aminoácidos. As proteínas simples somente fornecem aminoácidos quando hidrolisadas.

Proteínas são separadas e purificadas com base em diferenças nas suas propriedades, elas podem ser precipitadas seletivamente pela adição de sais. Os processos cromatográficos utilizam diferenças no tamanho, afinidades de ligação, carga e outras propriedades baseadas em troca iônica, exclusão por tamanho, afinidade e cromatografia líquida de alta performance. A eletroforese separa as proteínas com base em suas massas ou cargas. Todos os processos de purificação requerem um método para a quantificação ou a avaliação da proteína de interesse na presença de outras proteínas.

A purificação pode ser monitorada pela avaliação da atividade específica (NELSON e COX, 2011).

As sequências de aminoácidos são obtidas a partir da fragmentação de polipeptídeos em peptídeos menores com reagentes conhecidos por quebrar ligações peptídicas específicas. Uma proteína também pode ser deduzida a partir da sequência nucleotídica de seu gene correspondente no DNA (NELSON e COX, 2011).

Embora nenhum dos 20 aminoácidos encontrados em proteínas absorva luz na faixa do visível, os que absorvem mais fortemente no ultravioleta são os aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina. Uma vez que a maioria das proteínas contem resíduos de tirosina, a absorção em 280 nm em um espectrofotômetro, é uma maneira extremamente rápida e conveniente de determinar o conteúdo protéico de uma solução (LEHNINGER, 1976).

A qualidade de um alimento depende da sua composição, propriedades nutricionais e funcionais. As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos animal e humano e devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo das proteínas, deve-se levar em conta o aspecto qualitativo, ou seja, o seu valor nutritivo.

As principais fontes de proteínas de origem animal são leite e derivados, ovos e os vários tipos de carne. De origem vegetal são grãos, cereais e leguminosas.

As principais proteínas do leite são as caseínas e as do soro do leite são a α -lactalbumina e β -lactoglobulina, além da soroalbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas e as principais proteínas da clara são: ovalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, ovoinibidor, ovomucina, lisozima, ovoglicoproteína, ovoflavoproteína, ovomacroglobulina e avidina.

A soroalbumina bovina (BSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo representado 60% da massa total de proteínas plasmáticas. É constituída por uma única cadeia polipeptídica com 582 resíduos de aminoácidos, 17 pontes dissulfeto e um grupo sulfidrilo livre. Sua função biológica é a de fixação e transporte de pequenas moléculas orgânicas endógenas ou exógenas como hormônios, ácidos graxos, vitaminas e medicamentos como antibióticos. A complexação se dá normalmente por ligações não covalentes e frequentemente é reversível e não específica.

2.2. Validação de métodos analíticos

Atualmente, quando todos os caminhos levam a busca da qualidade total, torna-se indispensável conhecer cada fase do processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade dos resultados (VALENTINI, SOMMER e MATIOLI, 2007).

A validação de um método analítico é fundamental, tanto na elaboração de métodos de referência quanto na avaliação da competência de um laboratório em produzir dados confiáveis (ZONEN et al, 1999). A utilização de métodos validados é importante para o laboratório demonstrar sua qualificação (TAVERNIERS, DE LOOSE e VAN BOCKSTAELE, 2004).

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica. O processo de validação pertence a Garantia da Qualidade, uma vez que o conceito de Garantia da Qualidade é definido como a totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos para que possam ser utilizados para os fins aos quais tenham sido propostos (VALENTINI, 2007).

A temática da qualidade, segundo Moretto e Shib (2000), tem evoluído e reconhece quatro eras: a) era da inspeção da qualidade; b) era controle estatístico da qualidade; c) era da garantia da qualidade e d) era da gestão estratégica da qualidade. Atualmente tem sido possível identificar uma quinta era a era da validação.

A validação de métodos farmacêuticos deve estar em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela United States Pharmacopeia (USP), International Conference Harmonization (ICH) ou Food and Drug Administration (FDA) para ser aceita internacionalmente.

2.2.1. Definições

O termo validação de métodos é abrangente, principalmente se levarmos em conta que há, ou deveria haver, uma estreita relação entre calibração, validação e controle de qualidade. Muito tem se falado sobre validação e certificação porém, a falta de uma padronização na linguagem cria uma barreira para o entendimento total dos termos (ATHAIDE, 2000). Por não se tratar de um termo específico, muitas definições são encontradas na literatura:

- Consiste em checagens que devem ser realizadas para garantir que os parâmetros de desempenho de um método atendem as especificações relacionadas com a intenção de uso dos resultados analíticos (NATA, 1997);
- É o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação. Constitui o processo de determinação dos parâmetros de desempenho e das limitações de um método, com identificação dos fatores que podem mudar estes parâmetros e em qual extensão (EURACHEM, 2002);
- É a comprovação, pelo fornecimento de evidencia objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (EAL, 1997; EC, 2002; INMETRO, 2003; ISO, 2005).
- É o processo pelo qual é estabelecido, através de análises em laboratório, que as características fornecidas pelo método atendem aos requisitos proposto (USP, 2000).

Apesar das várias definições, o propósito da validação é o de investigar se o objetivo ao qual o método se propõe é alcançado através da análise dos parâmetros obtendo resultados analíticos com um aceitável nível de incerteza.

A validação de um método é necessária para confirmar adequação ao uso, ou seja, demonstrar que um protocolo, aplicável a um tipo específico de material, está apto para os fins pretendidos. Portanto, ela é uma ferramenta utilizada para demonstrar que um método analítico específico mede realmente o que se destina a medir (TAVERNIERS, DE LOOSE e BOCKSTAELE 2004; WATZIG, 2008).

2.2.2. Quando validar um método

A validação de um método deve ocorrer sempre que de forma direta ou indireta o processo de fabricação tenha sido alterado, quando a qualidade final do produto for duvidosa, equipamentos novos e em caso de implantação de um processo ou método analítico novo (VALENTINI, 2000). Isto significa que a validação é necessária sempre que qualquer componente do sistema de análise é alterado ou quando houver indícios de que o método estabelecido não produz mais resultados confiáveis (TAVERNIERS, DE LOOSE e BOCKSTAELE, 2004). É responsabilidade do analista escolher o

procedimento de validação e o protocolo mais adequado para o seu método de estudo (WATZIG, 2008).

Segundo a ISO/IEC 17025, ela estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados.

Validação está intimamente relacionada com o desenvolvimento do método. Quando um método está sendo desenvolvido, alguns parâmetros já estão sendo analisados nessa fase de desenvolvimento. Com os resultados desses parâmetros é possível verificar se há necessidade de uma mudança no protocolo original.

Quando um método já foi previamente validado seguindo um protocolo internacional, não há necessidade de testar todos os parâmetros da validação, apenas deve verificar se ele consegue as mesmas características de desempenho.

Existe um grande número de parâmetros recomendados na validação que dizem respeito tanto na identificação quanto na quantificação do analito (PIENKOWSKA, 2011). Esses parâmetros exigidos por diferentes organizações são muito parecidos e estão exemplificados na tabela 1.

Com uma visão mais ampla sobre validação, os resultados permitem ao analista entender melhor as vantagens e as limitações do método. Os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros, estabelecidos pelas diretrizes, devem ser documentados em um relatório de validação. Geralmente, os pontos fracos do método devem ser rapidamente identificados e eliminados e então, o parâmetro reprovado deve ser analisado novamente. Se o método falhar com relação a alguns parâmetros, o método deve ser modificado e então deve ser realizada uma nova validação (WATZIG, 2008).

Tabela 1: Parâmetros de desempenho segundo as diretrizes NATA, AOAC, EURACHEM e INMETRO.

	NATA (1997)	AOAC (1998)	EURACHEM (2002)	INMETRO (2003)
Linearidade	+	+	+	+
Faixa linear de trabalho	+	NA	+	+
Precisão	+	+	+	+
Exatidão	+	+	+	+
Sensibilidade	+	NA	+	+
Especificidade	+	+	+	+
Seletividade	+	NA	+	+
Limite de Detecção (LD)	+	+	+	+
Limite de Quantificação (LQ)	+	+	+	+
Robustez	NA	NA	+	+
Incerteza de medição	+	NA	+	NA
Recuperação	NA	+	+	NA

+ : Parâmetro obrigatório

NA: Parâmetro não apresentado

2.2.3. Plano de Validação

Antes de iniciar os ensaios de validação, é essencial o desenvolvimento de um plano de validação. Este plano deve descrever a finalidade do procedimento proposto para permitir um planeamento adequado do processo de validação (RENGERA, VÉGHB e FERENCZI-FODORB, 2011). As estratégias de validação são descritas na literatura com duas possíveis abordagens:

- Uma abordagem tradicional que se baseia na identificação de aspectos específicos de desempenho atribuindo valores numéricos a estes. Os indicadores

tradicionais de desempenho são precisão, aplicabilidade, detecção/determinação de limites, linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, recuperação, seletividade, e sensibilidade.

- Uma abordagem de adequação ao uso, baseado na incerteza (FEINBERG, 2007).

Num contexto geral, a validação de um método analítico consiste em pelo menos cinco fases distintas que são qualificação do sistema, avaliação de amostragem, preparação de amostras, análise e avaliação dos dados (ARAÚJO, 2009).

- Qualificação do sistema: a avaliação geral da qualificação do sistema permite verificar que o instrumento é adequado para a análise pretendida; os materiais (reagentes certificados, padrões externos e internos) são adequados para utilização em determinações analíticas; os analistas tem a formação adequada e qualificação; documentação como procedimentos analíticos, protocolo adequado aprovado com critérios pré-estabelecidos de aceitação. Se as qualificações gerais de um sistema são ignoradas e surge um problema, será difícil identificar a fonte do problema.
- Amostragem: a escolha de um método de amostragem adequado é de grande importância porque fornece garantias de que a amostra selecionada representa verdadeiramente o todo.
- Preparação das amostras: a preparação da amostra é um elemento chave para o sucesso da validação do método. Tem sido apontada que a preparação da amostra representa 60-80% da importância no processo de validação.
- Análise: a análise está relacionada com o instrumento usado para extrair informações quantitativas da amostra com nível de incerteza aceitável. A escolha de uma determinada análise é baseada nas propriedades químicas da espécie de análise, concentração da substância a ser analisada na amostra, matriz, custo, entre outras.
- Avaliação dos dados: o principal objetivo da avaliação dos dados é resumir e ter uma visão sobre um conjunto de dados usando a matemática e abordagens estatísticas. A avaliação dos dados permite extrair informações úteis e tirar conclusão sobre os resultados, e mais importante ainda, sobre o processo de validação de um modo geral.

2.2.4. Parâmetros utilizados na validação de métodos

Os parâmetros utilizados para determinar o desempenho dos métodos são: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Especificidade, Exatidão, Precisão, Precisão intermediária, Limite de detecção, Limite de quantificação, Robustez, Recuperação e Incerteza de medição. Os parâmetros experimentais da validação, conforme INMETRO (2003) estão descritos e detalhados a seguir:

2.2.4.1. Curva de calibração/ Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (INMETRO, 2003; SWARTZ, 2007).

Para a avaliação da linearidade de um método analítico, cálculos de regressão linear não são suficientes, devem ser calculados valores residuais. Essa análise de resíduo é a melhor forma visual de se verificar linearidade e é representada pela diferença entre o valor real e o valor previsto a partir da regressão linear para cada valor de concentração. Isso é diferente de uma curva padrão que se refere à relação entre a resposta instrumental e a concentração (HIBBERT, 2005; ROZET, 2011). Se os valores residuais são distribuídos aleatoriamente sobre a linha de regressão, a linearidade é confirmada, enquanto que tendências sistemáticas indicam uma não linearidade (TAVERNIERS, DE LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

2.2.4.2. Faixa Linear de Trabalho

Segundo INMETRO (2003), a faixa de trabalho é a faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado, ou seja, é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade, sob as condições especificadas no ensaio.

Faixa linear de trabalho também pode ser definida faixa de concentrações de analito ao longo da qual o método fornece resultados de ensaios proporcionais a concentração do analito, ou na qual um modelo linear pode ser aplicado com um nível de confiança conhecido (TAVERNIERS, DE LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

2.2.4.3. Especificidade/Seletividade

Especificidade analítica é a capacidade de um método para detectar apenas o analito de interesse. A especificidade é muito confundida com seletividade. Especificidade é quando um método produz resposta para somente aquele analito, e seletividade é quando produz resposta para vários analitos, porém distingue a resposta de um analito de outro. Um método é considerado específico e seletivo quando o analito de interesse é determinado mesmo na presença de outros componentes na matriz (WALTON, 2001; INMETRO, 2003).

De acordo com Eurachem (1998), especificidade e seletividade refletem a mesma característica e estão relacionados de modo que a especificidade significa 100% de seletividade. Um método deve primeiro demonstrar uma alta especificidade antes de realizar a quantificação.

Para Rozet (2011) e Swartz (2007) a seletividade é definida como a capacidade do método medir de forma inequívoca e diferenciar os analitos na presença de componentes interferentes que são esperados estarem presentes.

2.2.4.4. Exatidão

É a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.

A exatidão de um método analítico é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (USP, 2000).

2.2.4.5. Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaios mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. É considerada também como a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da

repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio-padrão (INMETRO, 2003).

2.2.4.6. Precisão intermediária

Os resultados da precisão intermediária são variações devido a eventos aleatórios, como diferentes dias, analistas e equipamentos. Na determinação da precisão intermediária, o modelo experimental deve ser muito bem traçado de modo que as variáveis do analista possam ser monitoradas (SWARTZ, 2007).

Para o Inmetro (2003) a precisão intermediária é a precisão sob condições de reprodutibilidade em que os resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, analistas ou equipamentos. Já para Taverniers, De Loose e Bockstaele (2004) é uma precisão sob condições em que resultados de ensaios independentes são obtidos com o mesmo método, em amostras idênticas, no mesmo laboratório, mas por diferentes analistas, utilizando diferentes equipamentos, ao longo de um período de tempo.

2.2.4.7. Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. É a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003). Portanto, o limite de detecção pode ser considerado como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com um valor exato (SWARTZ, 2007).

2.2.4.8. Limite de Quantificação (LQ)

É o limite inferior de quantificação de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão (ROZET, 2011; INMETRO, 2003). Para Swartz (2007), limite de quantificação é definido como a menor concentração de um analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições operacionais específicas do método.

2.2.4.9. Robustez

A robustez refere-se à sensibilidade do método apresentada nas mínimas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado. A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método.

Para a USP (2000), robustez é a capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros e fornecer resultados confiáveis.

Um método é considerado robusto quando o efeito dessas pequenas modificações é desprezível. A extensão dessas modificações deve refletir a variação normal nos parâmetros do método pois o objetivo da robustez é indicar os fatores que podem influenciar significativamente nos resultados, possibilitando compreender os potenciais problemas que podem ocorrer quando o método é repetido em diferentes laboratórios.

2.2.4.10. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis. Este parâmetro deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta).

Ensaio de recuperação estima a capacidade de um método analítico para medir corretamente um analito quando uma quantidade conhecida é adicionada. Os resultados de recuperação também avaliam a interferência da matriz sobre a amostra (WALTON, 2001).

2.2.4.11. Incerteza de medição

Atualmente para garantir a qualidade dos resultados, a validação de um método deve incluir entre os seus parâmetros o cálculo da incerteza. Segundo a diretriz NATA (1997), incerteza da medição é parte da expressão do resultado corrigido de uma medição, a qual define a faixa de valores dentro da qual o valor verdadeiro ou, se apropriado, o valor verdadeiro aceito, é esperado ser encontrado. Segundo EURACHEM (2002), essa estimativa da incerteza é um parâmetro único (usualmente desvio padrão ou intervalo de confiança) que expressa a faixa de valores possíveis com

base no resultado da medição. Parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem razoavelmente ser atribuídos ao mensurado.

Os parâmetros básicos analisados na validação de métodos analíticos não são suficientes para permitir uma correta interpretação e comparação dos resultados, para esse objetivo ser alcançado, é necessário calcular a medição da incerteza do ensaio. A ISO/IEC 17025 analisa a necessidade da estimativa da incerteza, no contexto de métodos de ensaio, mas não como um parâmetro de desempenho em processos de validação. Esta norma considera que uma estimativa razoável da incerteza deve estar baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição, devendo fazer uso, por exemplo, de experiência e dados de validação anteriores. Segundo Taverniers, De Loose e Bockstaele (2004) a estimativa da incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório. Este parâmetro cobre todas as fontes de erros do processo analítico, além daquelas obtidas nos processos de validação de métodos.

Para o cálculo da incerteza, devem-se levar em conta todas as fontes individuais de incerteza associada aos resultados finais, e cada contribuição de incerteza é expressa como um desvio-padrão. É importante que o método esteja livre de erros sistemáticos para um cálculo correto da incerteza.

A incerteza nos limites próximos ao de detecção e quantificação pode ser maior. Considerando que os resultados analíticos não são somente concentrações, mas sim estimativas de concentração propensas a erros, nas medições abaixo dos limites estas estimativas acompanhadas por suas respectivas incertezas podem levar a resultados negativos. Limites não são diretamente relevantes na estimativa de incerteza, porém a incerteza abaixo do limite de detecção e próxima ao limite de quantificação pode exigir cuidados especiais.

No entanto, o cálculo da incerteza ainda é raro embora seja um passo obrigatório para os laboratórios que visam atingir o credenciamento na ISO 17025. A incerteza de medição mostra ao analista que um resultado é apenas uma estimativa da concentração real da amostra, ela quantifica a dúvida sobre um resultado a fim de ajudar o analista a tomar decisões corretas, sabendo dos riscos de conformidade e não-conformidade (ROZET, 2011). A estimativa da incerteza deve ser realizada para assegurar que os

resultados analíticos a partir de testes e relatórios de laboratórios pode ser usada para decidir sobre a aceitação ou rejeição de um determinado método, além disso, pode ser verificado e avaliado o desempenho de um laboratório de ensaio.

2.2.5. Espectrofotometria

A avaliação de uma metodologia analítica é uma etapa básica em sistemas de qualidade e incorpora os programas de Boas Práticas de Laboratório visando garantir que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar empregando diferentes procedimentos em função do objetivo da análise (COTTA, 2006). Segundo Zaia (1998) são muito variados os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais, no entanto, as metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas no ultra-violeta e no visível. A principal vantagem dos métodos colorimétricos e espectrofotométricos é a de proporcionarem um meio simples para determinar quantidades diminutas de substâncias.

Um espectrômetro é um instrumento que dispõe de um sistema ótico que pode provocar a dispersão da radiação eletromagnética incidente, e com a qual se podem fazer medidas da radiação transmitida num certo comprimento de onda da faixa espectral. Um fotômetro destina-se a medir a intensidade da radiação transmitida ou uma função desta intensidade. Um espectrômetro e um fotômetro, combinados num espectrofotômetro, podem gerar um sinal que corresponde à diferença entre a radiação transmitida por um material tomado como referência e a radiação transmitida pela amostra analisada, num certo comprimento de onda. Na análise espectrofotométrica a fonte de radiação emite até a região ultravioleta do espectro. Desta radiação selecionam-se comprimentos de onda definidos que constituem bandas, com largura menor que 1nm. Este procedimento necessita de um espectrofotômetro (JEFFERY et al, 1992). O espectro vai de 185 a 800 nm, sendo ultravioleta de 185 a 400 nm e o espectro visível de 400 nm até 800 nm.

A espectrofotometria é uma técnica analítica baseado na absorção de luz por moléculas que passam do estado fundamental para o excitado, quando a luz é absorvida por um analito, a energia radiante do feixe de luz diminui, sendo a absorbância de luz diretamente proporcional a concentração das espécies absorventes de luz na amostra (SEVERO JUNIOR, 2007). A relação quantitativa entre o fenômeno de absorção e o

número de espécies moleculares que sofrem absorção é dada pela lei de Lambert-Beer (FREITAS, 2006).

A absorção de radiação se deve ao fato de as moléculas terem elétrons que podem ser promovidos a níveis de energia elevados mediante a absorção de energia. A energia necessária pode ser a proporcionada pela radiação com comprimentos de onda no visível, e o espectro de absorção estará na região do visível. Em outros casos, é necessária energia maior, associada à radiação ultravioleta. Além da variação de energia eletrônica, que é consequência da absorção da radiação, há também variações associadas à energia de vibração dos átomos na molécula e variações da energia de rotação. Isto significa que as quantidades de energia absorvidas serão diversas, dependentes dos níveis vibracionais atingidos pelos elétrons. Os elétrons numa molécula podem ser classificados em três tipos diferentes.

- a) Elétrons com uma ligação covalente (ligação σ): são elétrons fortemente ligados, e para excitá-los é necessária radiação de alta energia (pequeno comprimento de onda).
- b) Elétrons ligados a átomos como os do cloro, do oxigênio ou do nitrogênio, por um par isolado. Este elétrons não-ligantes pode ser excitados por energia menor (comprimento de onda maior) que os elétrons ligantes fortemente ligados.
- c) Elétrons em ligações duplas ou triplas (orbitais π) que podem ser excitados com relativa facilidade. Nas moléculas que tem ligações duplas alternadas (sistemas conjugados), os elétrons π estão deslocados e exigem menos energia para a excitação, de modo que a absorção se desloca para os comprimentos de onda maiores.

A espectrofotometria é considerada um processo analítico sensível, rápido, cujos resultados são precisos. Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução que contém uma espécie absorvente, uma parte dessa energia radiante é absorvida e então se estabelece uma relação entre a absorbância ou transmitância com a concentração do analito (FREITAS, 2006). Quando essa radiação atravessa a solução, os elétrons das ligações são excitados e ocupam um nível superior de energia, absorvendo parte da energia que passa pela solução. A absorção vai depender do comprimento de onda da radiação e da estrutura eletrônica da molécula, ou seja, quando a luz (monocromática ou heterógena) incide sobre um meio homogêneo, uma parcela da

luz incidente é refletida, uma outra parcela é absorvida no meio e o restante é transmitido (JEFFERY, 1992).

Tendo em conta que a cor de uma substância reflete a sua capacidade de absorver seletivamente na região visível do espectro eletromagnético, é claro que, depois de ter conseguido medir com elevado grau de exatidão a intensidade da luz, a exatidão das medidas, na análise de uma solução corada, em virtude da absorção seletiva de um dos seus componentes, será aumentada se forem feitas no comprimento de onda da radiação absorvida. A este respeito, deve-se acentuar que a cor que se observa provem da radiação que não é absorvida, ou, em outras palavras, a radiação que é transmitida pela solução corada. Esta cor, ou a cor correspondente a esta radiação, é a cor complementar da cor correspondente à radiação absorvida.

Um espectrofotômetro é formado basicamente por uma fonte de radiação, um monocromador, cubeta onde se coloca a amostra e um detector de sinal. Nos espectrofotômetros, para cobrir todo o intervalo de comprimento de onda, opera-se com duas lâmpadas. A primeira, usualmente uma lâmpada de tungstênio- halogênio (ou de quartzo-iodo), cobre os comprimentos de onda do espectro visível até o ultravioleta próximo (300-320 nm). A lâmpada tem um bulbo de quartzo a fim de permitir a passagem da radiação ultravioleta. Uma segunda lâmpada, de hidrogênio ou de deutério, é usada para medidas no ultravioleta. A de deutério é preferida em virtude da intensidade da radiação ser mais elevada. Esta lâmpada também tem um bulbo de quartzo. Também se usam lâmpadas de xenônio, com domínio espectral de 250 a 600 nm (JEFFERY, 1992).

O aparelho ainda pode ser de feixe simples ou duplo, os espectrofotômetros mais modernos são de feixe duplo que cobrem a região de 200 a 800 nm mediante um processo de varredura contínua e automática. Nestes instrumentos, o feixe de radiação, de uma lâmpada de tungstênio ou deutério, depois de monocromatizado, é dividido em dois feixes idênticos, um dos quais passa através de uma célula de referência e o outro através da célula da amostra. O sinal da absorção, na célula de referência, é automaticamente subtraído do sinal da célula da amostra e o sinal líquido resultante corresponde a absorção dos componentes na solução amostra.

O comportamento de uma amostra em relação à absorbância e sua concentração geralmente obedece uma lei que é a lei de Lambert-Beer. A lei de Lambert afirma que, quando a luz monocromática passa através de um meio transparente, a taxa de

diminuição da intensidade com a espessura do meio é proporcional à intensidade da luz. Isto é equivalente a afirmar que a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente com a espessura do meio absorvedor, ou que qualquer camada do meio com certa espessura absorve sempre a mesma fração da luz incidente sobre ela. Já Beer estudou o efeito da concentração do constituinte corado, numa solução, sobre a transmissão ou a absorção da luz e descobriu a mesma relação entre a transmissão e a concentração que Lambert havia descoberto entre a transmissão e a espessura da camada, isto é, a intensidade de um feixe de luz monocromática diminui exponencialmente com a concentração da substância absorvedora (JEFFERY, 1992). A medida de absorção de luz por um espectrofotômetro é utilizada para detectar e identificar moléculas e para medir suas concentrações em solução. A fração da luz incidente absorvida por uma solução em um comprimento de onda está relacionada a espessura da camada envolvida na absorção de luz (comprimento do caminho da luz) e a concentração da espécie que absorve a luz. Essas duas relações é que formam a lei de Lambert-Beer (NELSON e COX, 2011).

A lei não vale quando o soluto corado forma complexos, cuja composição depende da concentração. Podem ocorrer também discrepâncias quando não se usa luz monocromática. O comportamento de uma substância pode ser sempre ensaiado pelo gráfico de $\log I_0/I_t$ (onde I_0 é a intensidade da radiação da luz incidente e I_t é da luz transmitida) ou $\log 1/T$, contra a concentração; a lei fica confirmada quando uma reta passa pelos pontos experimentais e pela origem. No caso de soluções que não obedecem a lei de Beer, é mais conveniente preparar uma curva de calibração mediante uma serie de padrões com as concentrações conhecidas (JEFFERY, 1992).

A equação que representa a lei de Lambert-Beer é:

$$A = \epsilon bc$$

Onde:

A: é a absorbância (sem unidades)

ϵ : é a absorvidade molar em unidades de $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

b: comprimento do caminho da amostra, ou seja, é o comprimento do caminho que a luz tem que atravessar a cubeta (em centímetros).

c: é a concentração do elemento que absorve na solução, expresso em $mol \cdot L^{-1}$

O método espectrofotômetro é um método econômico e de fácil execução quando comparado a outros métodos, e pode ser utilizados em análises rotineiras de controle de qualidade de medicamentos e alimentos.

2.2.6. Método de Lowry

O método de Lowry foi proposto primeiramente por Wu em 1922 sendo o mais utilizado para a determinação de proteínas (LOWRY, 1951). O método se baseia numa mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteau) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu^{+2} e produz um composto em absorção máxima de 750 nm. Os aminoácidos cromógenos são tirosina e triptofano. O desenvolvimento da cor do ensaio parece ser bastante estável até 4 horas após a adição do reagente de Folin-Ciocalteau (POMORY, 2008).

O método de Lowry é altamente sensível, apresenta uma melhor exatidão em relação a outros métodos, consome uma menor quantidade de amostras e dependendo do caso está menos suscetível a alguns tipos de interferentes (ZAIA, 1998). Apesar dessas vantagens, o método apresenta longo tempo de análise, possui absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e segue a lei de Lambert-Beer apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (LOWRY, 1951). Porém, a razão para a curvatura da curva padrão parece não ser uma questão de desvio da lei de Lambert-Beer, essa curvatura ainda não é muito bem explicada. Para resolver estes problemas, tem sido propostas várias modificações do método de Lowry como a proposta por Hartree no método melhorando a faixa de linearidade e uniformizando as absorvidades específicas para algumas proteínas (ZAIA, 1998).

Outra desvantagem do método seria a interferência dos íons magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}). A hipótese para a interferência do cálcio não está muito bem definida, mas a do magnésio seria que o íon magnésio liga-se a proteína e a alguns constituintes do reagente B de Lowry e assim reduz a sua sensibilidade ao reagente de Folin (XIE, 1994). A adição de oxalato de sódio reduziu significativamente os erros na determinação da concentração de proteína em que havia interferência do cálcio, o oxalato de sódio é um quelante de cálcio (MORRISSEY e WOLTERING, 1989).

Dawson e Heatlie (1984) em seus estudos comprovaram que outro interferente do método de Lowry seria a luz. Como as absorbâncias foram consistentemente mais elevadas em amostras que foram expostas diretamente a luz natural, concluiu-se que o ensaio pode ser fotossensível.

Apesar de todos os interferentes, o método de Lowry é um dos mais utilizados para quantificação de proteínas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos Gerais para a Competências dos Laboratórios de Ensaio de Calibração.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Peer- verified methods program. **Manual on policies and procedures**, 1998.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, n.877, p.2224-2234, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, Rio de Janeiro, 2005.

ATHAIDE, A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. **Controle de Contaminação**, 2000.

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência à habilitação**. Brasília, DF, p. 41-42, 2005.

CARERI, M.; MANGIA, A. Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1000, p.609-635, 2003.

CAMPOS, F.; GUILLEN G.; REYES, J. L.; COVARRUBIAS, A. A. A general method of protein purification of recombinant unstructured non-acidic proteins. **Protein Expression and Purification**, n.80, p.47-51, 2011.

COTTA, J. A; SALAMI, F. H.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista Analytica**, n. 26, p. 68-75, 2006-2007.

DOQ-CGRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos – Documento de caráter orientativo. Coordenação Geral de Acreditação, 2010.

DOWSON, J. M.; HEATLIE, P. L. Lowry method of protein quantification: evidence for photosensitivity. **Analytical Biochemistry**, n. 140, p. 391 – 393, 1984.

EAL – P11. **Validation of test methods – General principles and concepts. EAL European cooperation for accreditation of laboratories.** 1997.

EURACHEM/CITAC: **Determinando a Incerteza nas Medições Analíticas.** 2 ed. QUAM: 2002.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Guidance document on residue analytical methods**, SANCO/825/00, 2000.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Implementing council directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results.** 2002.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, n.1158, p.174-183, 2007.

FREITAS, S.K.B. **Uma Metodologia para Screening Analysis de Sucos Cítricos Utilizando um Analisador Automático Fluxo-Batelada, Espectrometria UV-VIS e**

Técnicas Quimiométricas. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba. 2006.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

HIBBERT, D. B. Method Validation. **Quality Assurance**. p. 469-477. Australia, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

ISO (International Standard Organization). ISO 9000. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. Geneva: ISO, 2005.

JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAN, J.; DENNEY, R. C. **Análise Química Quantitativa – Vogel**. 5 ed. Editora LTC: Rio de Janeiro, 1992.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. Ed. 2; v. 1; Editora Edgard Blucher: São Paulo, 1976.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-276, 1951.

MORETTO L. D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**, v. 4, p. 40 – 48, 2000.

MOROTO, A. et al. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 173-185, 1999.

MORRISSEY, T. B.; WOLTERING, E. A. Sodium oxalate corrects calcium interference in Lowry Protein Assay. **Journal of Surgical Research**, n. 47, p. 273 – 275, 1989.

NATA. Technical Note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OKUTUCU, B. et al. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 709-711, 2007.

POMORY, C. M. Color development time of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, n. 378, p. 216 – 217, 2008.

PIENKOWSKA, K. M. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes. II. Validation of the method for analysis of pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 56, p. 851-858, 2011.

RENGERA, B.; VÉGHZ, Z.; FERENCZI-FODORB, K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, n.1218, p.2712-2721, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 55, p. 848 – 858, 2011.

SEVERO JUNIOR, J. B. et al. Interferência do pH, concentração de BSA e de tampão fosfato sobre a resposta na determinação de proteína total pelo método do Biureto. **Exacta**, São Paulo, v. 5, n.2, p. 335-341, jul./dez. 2007.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. Livraria Varela: São Paulo, 1996.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SWARTZ, M. Method Validation. **Chromatography**. Milford, MA, USA. 2007.

TAVENIERS, I.; De LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535 – 552, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Ed. 24; Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI G. Validação de Métodos Analíticos. **Arq Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26 – 31, 2007.

XIE, Q.; BURNELL, G. M. Interference of Mg^{2+} and Ca^{2+} on protein determination with Lowry's method. **Comp. Biochemistry Physiol.** v. 107B, n. 4, p. 605 – 608, 1994.

WALTON, R. M. Validation of laboratory tests and methods. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 2, p. 59 – 65, 2001.

WATZIG, H. Cap 10- Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**, v. 9, 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZOONEN, P. V.; HOOGERBRUGGE, R.; GORT, S. M.; WIEL, H. J. V. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9+10, p. 584 – 593, 1999.

CAPÍTULO II

RESUMO

Validação é a comprovação, pelo fornecimento de evidencia objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. A validação de um método é necessária para confirmar adequação ao uso, ou seja, demonstrar que um protocolo, aplicável a um tipo específico de material, está apto para os fins pretendidos. Portanto, ela é uma ferramenta utilizada para demonstrar que um método analítico específico mede realmente o que se destina a medir. Ela deve ocorrer sempre que de forma direta ou indireta o processo de fabricação tenha sido alterado, quando a qualidade final do produto for duvidosa, equipamentos novos e em caso de implantação de um processo ou método analítico novo. As proteínas desempenham um papel extremamente importante na determinação das propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos. Além disso, o valor biológico atribuído a presença de peptídeos bioativos nas suas sequências primárias faz com que as proteínas sejam consideradas ingredientes potenciais para a promoção da saúde. Os métodos mais utilizados para quantificar proteínas são Biureto, Bradford, BCA, Kjeldahl e de Lowry, sendo o método de Lowry o mais utilizado. Este trabalho objetivou validar o método de Lowry com algumas modificações demonstrando que o mesmo é adequado aos objetivos que se propõe e uma avaliação do cálculo da estimativa da incerteza da medição. Os parâmetros analisados foram os preconizados por NATA (National Association of Testing Authorities - Austrália). A proteína utilizada em todos os experimentos foi albumina bovina sérica – BSA. A metodologia foi a padrão desenvolvida por Lowry com algumas modificações. Os resultados dos parâmetros analisados mostraram que o método modificado apresenta sensibilidade de $0,0046 \mu\text{g.mL}^{-1}$; linearidade de $10\text{-}80 \mu\text{g.mL}^{-1}$; precisão por repetitividade de $0,152 \mu\text{g.mL}^{-1}$; precisão intermediária de $0,450 \mu\text{g.mL}^{-1}$; faixa linear de trabalho: $20 - 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$; limite de detecção: $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; limite de quantificação de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$; o método é robusto e foi realizada a medição da incerteza. O método foi desenvolvido e validado.

Palavras-chave: Proteína; Validação; Lowry; Incerteza do método

ABSTRACT

Validating is proof, by providing objective evidence, that the requirements for a specific use or application have been met. The validation of a method is needed to confirm fitness for use, to demonstrate that a protocol applicable to a particular type of material is fit for its intended purpose. Therefore, it is a tool used to demonstrate that a specific analytical method actually measures what is intended to be measured. It should occur whenever a direct or indirect manufacturing process was changed when the final product quality is questionable, and new equipment in the event of a process or implementation of new test method. Proteins play an extremely important role in determining the functional and nutritional properties of foods. Moreover, the biological value attributed to the presence of bioactive peptides in their primary sequences makes the proteins are considered potential ingredients for the promotion of health. The methods used to quantify proteins are Biuret, Bradford, BCA, Kjeldahl, and Lowry, the method of Lowry the most used. This study aimed to validate the method of Lowry with some modifications demonstrating that it is appropriate to the goals and proposes a review of the calculation of the estimated measurement uncertainty. The parameters analyzed were those recommended by NATA (National Association of Testing Authorities - Australia). The protein used in all experiments was bovine serum albumin - BSA. The methodology was developed by the standard Lowry with some modifications. The results of the analyzed parameters showed that the modified method has a sensitivity of $0.0046 \mu\text{g.mL}^{-1}$; linearity of $10\text{-}80 \mu\text{g.mL}^{-1}$; precision repeatability of $0.152 \mu\text{g.mL}^{-1}$, intermediate precision of $0.450 \mu\text{g.mL}^{-1}$; linear response range: $20\text{-}80 \mu\text{g.mL}^{-1}$; detection limit: $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; quantitation limit of $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, the method is robust and was made measuring the uncertainty. The method was developed and validated.

Keywords: Protein; validation; Lowry; Uncertainty of the method

1. INTRODUÇÃO

Durante anos a seleção e o desenvolvimento de métodos de ensaio foram considerados assuntos de grande importância para os laboratórios, com frequente negligência sobre as condições de aplicação prática dos mesmos. Possivelmente, esta ênfase aconteceu devido ao fato de que a maioria das organizações, governamentais ou de padronização, desenvolvia métodos e incorporava-os as legislações ou padrões internacionais, mas não utilizava nenhum mecanismo para verificar o desempenho desses métodos em suas aplicações. Felizmente, tal panorama tem sido suplantado pela necessidade de demonstração de sucesso na aplicação de métodos de ensaio (WOOD, 1999). Esta confirmação, por evidência objetiva de que os requisitos para uso pretendido de um método são atendidos, constitui a validação (ISO, 2005).

O tema validação de métodos de ensaio tem recebido considerável atenção em literaturas científicas, comitês industriais e agências regulamentadoras, com grande procura por parte dos laboratórios e organismos acreditadores por protocolos para planejamento e controle destes processos. No entanto, a diversidade de áreas de aplicação, de parâmetros de desempenho a serem avaliados, bem como de terminologia e definições, tem dificultado a harmonização dos processos de validação em termos de determinação de indicadores de qualidade dos métodos em ensaio e das respectivas modalidades de cálculos associadas a estes indicadores (ANTIGNAC et al, 2003).

Especificamente na área de análise de alimentos, a validação de métodos está estritamente relacionada com segurança alimentar e comércio internacional. Os resultados provenientes dos métodos do ensaio muitas vezes subsidiam a formulação de políticas de saúde pública para melhoramento da qualidade dos alimentos disponibilizados a população do país (BRASIL, 2006).

Por não se tratar de um termo específico, diversas definições são encontradas na literatura para validação de métodos. Segundo a diretriz australiana NATA, validação consiste em checagens que devem ser realizadas para garantir que os parâmetros de desempenho de um método são conhecidos e demonstram que o método é cientificamente adequado nas condições em que é aplicado. Estabelece, por meio de um conjunto de estudos laboratoriais sistemáticos, que os parâmetros de desempenho do método atendem as especificações relacionadas com a intenção de uso dos resultados analíticos (NATA, 1997).

Um processo analítico pode ser dividido nas etapas de desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação do método. Na prática, a passagem de uma etapa para outra acontece quase que de forma imperceptível, embora seja aconselhável que o método a ser validado esteja claramente descrito antes de iniciar o processo de validação. A revalidação pode ser necessária se algum aspecto operacional do método for modificado durante a rotina de sua aplicação ou se houver indicação de que o método estabelecido não é mais adequado (TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004).

A ISO/IEC 17025 estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados.

As formas de validação ou de verificação de desempenho de métodos de ensaio citadas pela ISO/IEC 17025 incluem: calibração com uso de padrões ou materiais de referência; comparações com outros métodos; comparações interlaboratoriais; avaliação sistemática dos fatores que influenciam o resultado; e avaliação da incerteza dos resultados.

O processo de validação demanda uma decisão sobre quais parâmetros de desempenho precisam ser avaliados. Os parâmetros utilizados para determinar o desempenho dos métodos são: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Especificidade, Exatidão, Precisão, Precisão intermediária, Limite de detecção, Limite de quantificação, Robustez, Recuperação e Incerteza de medição.

A ISO/IEC 17025 analisa a necessidade da estimativa da incerteza, no contexto de métodos de ensaio, mas não como um parâmetro de desempenho em processos de validação. Esta norma considera que uma estimativa razoável da incerteza deve estar baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição, devendo fazer uso, por exemplo, de experiência e dados de validação anteriores. Segundo Taverniers, De Loose & Van Bockstaele (2004) a estimativa da incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório. Este parâmetro cobre todas as fontes de erros do processo analítico, além daquelas obtidas nos processos de validação de métodos.

2. Material e Métodos

2.1. Material

A proteína utilizada em todos os experimentos foi albumina bovina sérica – BSA (SigmaAldrich).

2.2. Métodos

2.2.1. Doseamento da proteína por espectroscopia do UV-Visível

A massa utilizada de BSA foi de 25 mg dissolvida em 250 mL de água destilada. Foram realizadas diluições cuja concentração dos dez pontos permaneceu entre 10µg e 100 µg. Os pontos foram: 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg e 100 µg. Após a adição da amostra, o volume foi completado com água destilada para 1,0 mL. Foi adicionado 2,0 mL em cada tubo do reagente C que é formado pela mistura de 50 mL de solução Na₂CO₃ a 2% em NaOH 0,1 N com 1,0 mL da solução de CuSO₄.5H₂O a 0,5% e citrato de sódio 1%. Após essa adição os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos e então se adicionou 0,2 mL do reagente Folin Ciocalteau 1:1 em água destilada. Terminada a adição, os tubos foram agitados em vortex e foram deixados em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em 750 nm. O reagente Folin Ciocalteau foi preparado no laboratório.

No trabalho original, após a adição da amostra o volume é acertado para 1,0 mL com NaOH, neste trabalho o volume foi acertado com água destilada. No método proposto por Lowry (1951) o volume do reagente C é de 5,0 mL e do reagente D é de 0,5 mL. Neste trabalho os volumes foram 2,0 mL e 0,2 mL respectivamente como mostra a tabela 2. A composição dos reagentes encontra-se no ANEXO 1 .

Para se determinar o comprimento de onda ideal, foi feita uma varredura de 400 a 900 nm. O pico foi exatamente em 750 nm, o que está de acordo com a literatura.

Tabela 2: Protocolo de preparo das amostras

Amostra	Alíquota (μL)	BSA (μg)	Vol Água (μL)	Reagente C (mL)	Reagente D (mL)
1	100	10	90	2	0,2
2	200	20	80	2	0,2
3	300	30	70	2	0,2
4	400	40	60	2	0,2
5	500	50	50	2	0,2
6	600	60	40	2	0,2
7	700	70	30	2	0,2
8	800	80	20	2	0,2
9	900	90	10	2	0,2
10	1000	100	0	2	0,2

2.2.2. Parâmetros avaliados

2.2.2.1. Linearidade

A curva analítica de linearidade foi ensaiada com 10 repetições para cada concentração de proteína em triplicata no intervalo previamente testado que foi de 10 μg a 100 μg .

2.2.2.2. Faixa Linear de Trabalho

O intervalo linear de trabalho da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método e foi determinada matematicamente pela relação $S/X \times 100$, sendo S = desvio-padrão, X = média da massa determinada.

2.2.2.3. Precisão

Foi determinada por meio da repetitividade através de 10 repetições da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ realizada 7 vezes.

2.2.2.4. Sensibilidade

A sensibilidade é o coeficiente angular da reta, portanto, é expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração obtida pela linearidade.

2.2.2.5. Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado a partir de concentrações decrescentes de proteínas de $20 \mu\text{g}$ até $1,25 \mu\text{g}$. Esse limite foi repetido 10 vezes.

2.2.2.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado a partir dos resultados da curva de linearidade.

2.2.2.6. Robustez

Neste parâmetro foram avaliadas as seguintes variações:

- (A) Mistura Na_2CO_3 2% / CuSO_4 1% + Tartarato de sódio 2%
- (a) Mistura Na_2CO_3 1,8% / CuSO_4 0,8% + Tartarato de sódio 1,8%
- (B) Tempo de 10 minutos
- (b) Tempo de 8 minutos
- (C) Reagente Folin Ciocalteau 0,2 mL
- (c) Reagente Folin Ciocalteau 0,18 mL

Experimentalmente um protocolo fatorial proposto por Yuden-Steiner foi utilizado para avaliar a robustez.

2.2.2.7. Incerteza de medição

O cálculo da incerteza foi feito a partir da combinação de todas as fontes individuais de incerteza e suas subcausas.

2.2.3. Análise Estatística

A análise estatística foi feita nos programas Excel 2010 e Origin 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Linearidade e Sensibilidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Ela pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pela relação dos mínimos quadrados.

Neste trabalho a linearidade foi obtida através do ensaio de 10 curvas com dez pontos e sendo cada ponto realizado em triplicata e o resultado é mostrado na Figura 1. A partir da equação da reta é possível obter a sensibilidade que neste método foi de 0,0046.

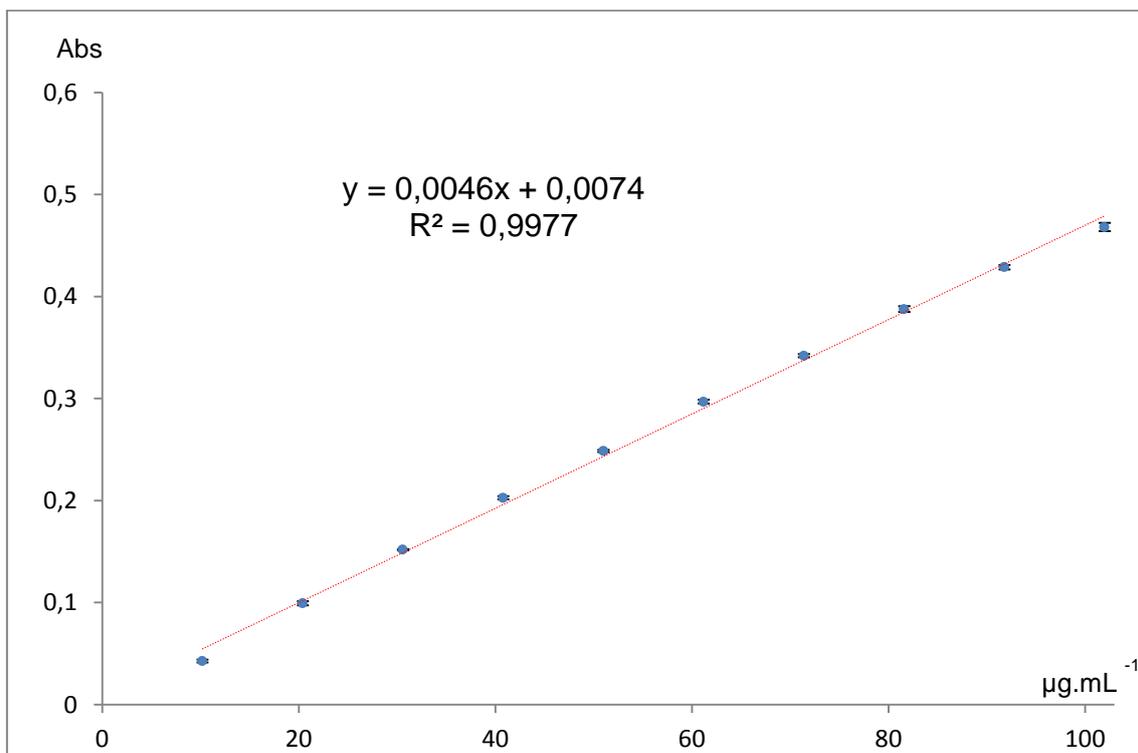


Figura 1: Determinação do diagrama de calibração da proteína BSA.

O diagrama de calibração apenas nos mostra a linearidade dos valores adicionados do analito e a sua respectiva massa encontrada, entretanto, é necessário investigar dentro desta linearidade qual é o intervalo do método em que a linearidade propriamente dita é obtida, considerando a incerteza da medição. Para tanto, calcularam-se os valores de desvio-padrão para cada ponto de repetição juntamente com sua média e a partir da relação entre o coeficiente do desvio e média pela massa nominal adicionada, obteve-se a Figura 2. Este tipo de análise é conhecido como análise de resíduos, pois apesar do coeficiente de regressão linear ser frequentemente utilizado como adequação da reta a curva e mostrar linearidade, os desvios de linearidade não são detectados visualmente sendo necessária a análise de resíduos. Através da análise de resíduos podemos verificar que a linearidade situa-se na faixa de 10 a 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

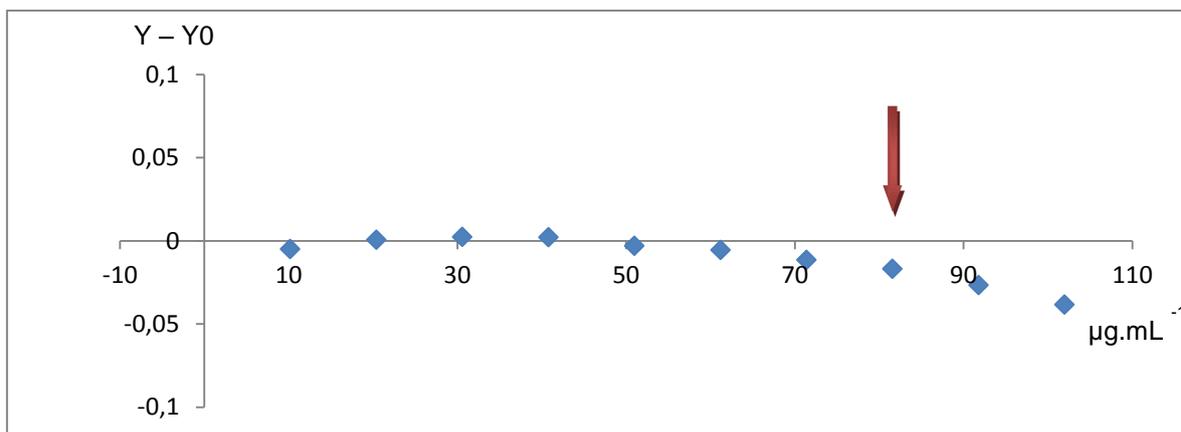


Figura 2: Avaliação da linearidade a partir da análise de resíduos ($Y - Y_0$), sendo Y_0 massa de BSA adicionada e Y a massa determinada.

O trabalho original de Lowry et al (1951) diz que o método é linear de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para ficar claro que o coeficiente de correlação do diagrama de calibração não indica linearidade, foram feitos diagramas de calibração e suas respectivas análises de resíduos por faixas de concentração como mostram as figuras 3, 4 e 5. No extremo superior, apesar do coeficiente de correlação ser considerado bom, a análise de resíduos mostra a tendência a não linearidade dos resultados.

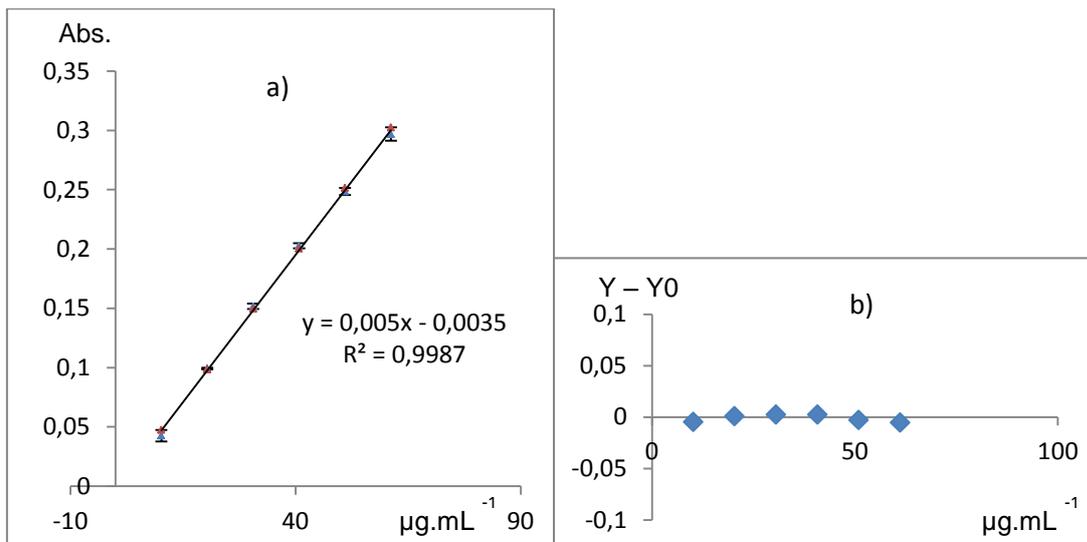


Figura 3: a) Diagrama de calibração da proteína BSA. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 10 e 60 µg.mL⁻¹.

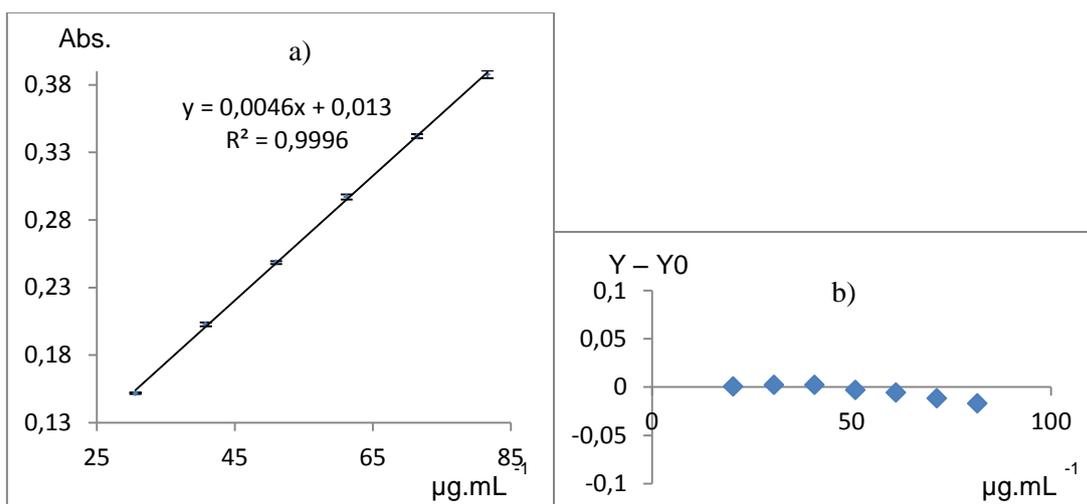


Figura 4: a) Diagrama de calibração da proteína BSA na faixa de concentração entre 20 e 80 µg.mL⁻¹. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 20 e 80 µg.mL⁻¹.

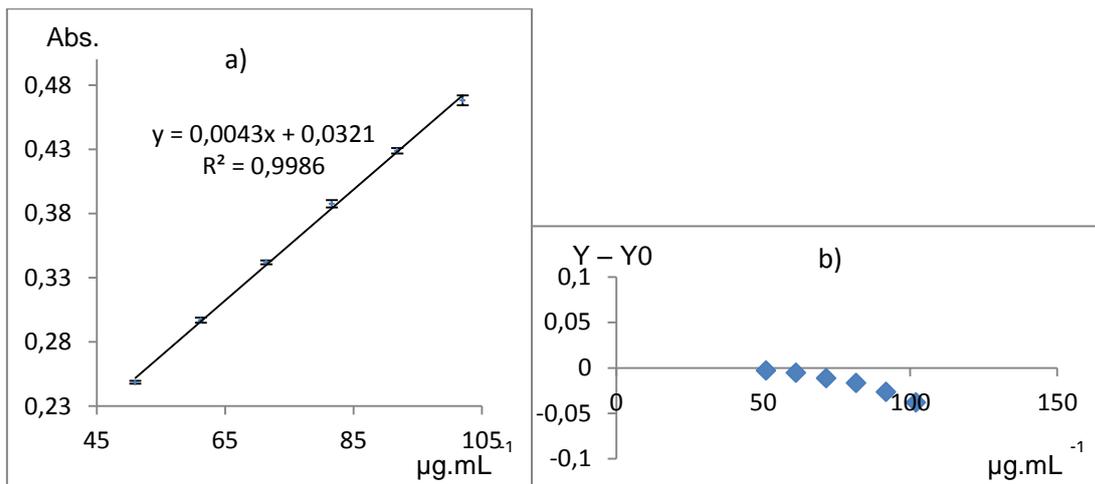


Figura 5: a) Diagrama de calibração da proteína BSA na faixa de concentração entre 50 e 102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. b) Linearidade da proteína BSA na faixa de concentração entre 50 e 102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.2. Faixa Linear de Trabalho

É o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito para o qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade. Neste trabalho encontramos uma faixa linear de trabalho entre 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, entretanto, por assumirmos precisão esperada quando o coeficiente de variação for menor que 5%, a faixa linear de trabalho encontra-se entre 20 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A faixa linear de trabalho é demonstrada nas Figura 6.

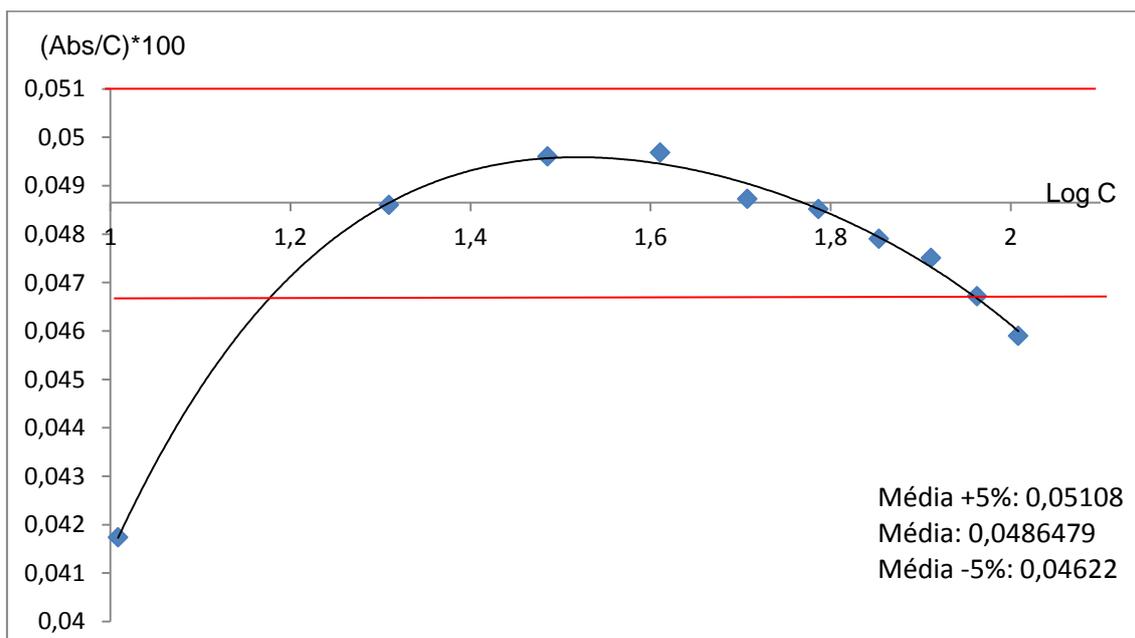


Figura 6: Determinação da faixa linear de trabalho (limite inferior e superior) através da correlação $[(\text{Resposta}/C) \times 100] \times \log C$.

3.3. Limite de Detecção

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Neste trabalho foi possível uma detecção de $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como mostra a Figura 7. Para o limite de detecção partiu-se da menor concentração onde foi possível demonstrar linearidade e estar dentro da faixa linear de trabalho, concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e diluiu-se até $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pode-se afirmar que a reta que passa pelo ponto $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ está dentro da lei de Lambert-Beer e, portanto, todos os outros pontos pertencentes a esta reta. No ponto da inflexão das retas pode-se afirmar que a leitura de absorbância e sua respectiva concentração é a mesma. Para calcular a concentração na intersecção das retas igualaram-se as equações e chegou-se no resultado de $3,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$, aproximadamente $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

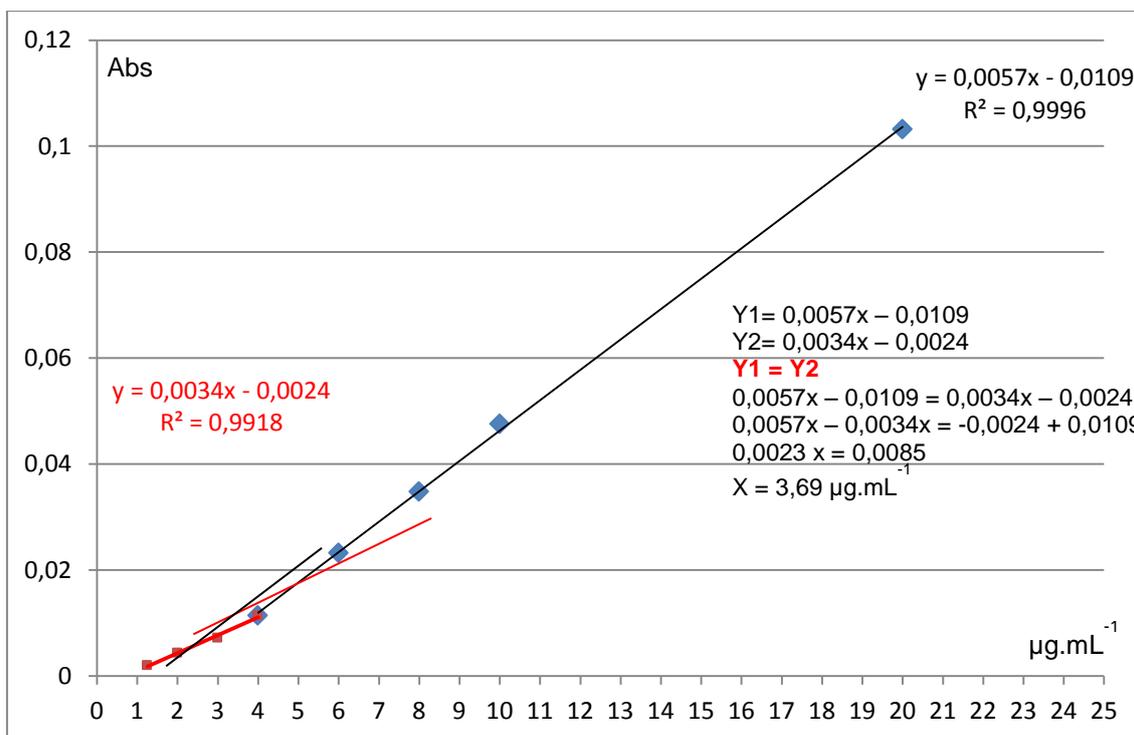


Figura 7: Limite de detecção da proteína BSA ($4,0 \mu\text{g/mL}$).

3.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação que é o limite inferior de quantificação de um composto presente em uma amostra que foi determinado quantitativamente com precisão e exatidão está demonstrado na figura 8. O limite de quantificação para uma incerteza menor que 3% foi de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para concentrações na ordem de 10^{-6} (ppm)

considera-se variação de até 16%, entretanto neste trabalho, o critério adotado foi menor que 3%.

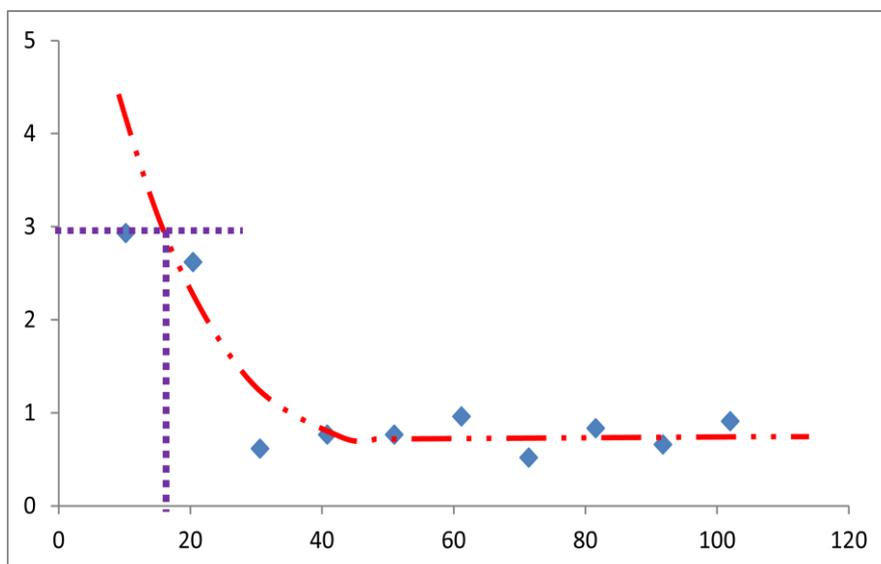


Figura 8: O limite (LQ) pode ser estabelecido em 20 ppm para uma incerteza na medição, menor que 3% ($u < 3\%$).

3.4. Precisão

A precisão foi obtida por repetitividade, ou seja, pela concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo método e mesmo laboratório e por precisão intermediária. É um procedimento aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea em condições idênticas. Neste trabalho a precisão por repetitividade e precisão intermediária foram obtidas por 10 repetições como mostram as figuras 9 e 10. A precisão por repetitividade foi de $0,152 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e por precisão intermediária foi $0,450 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando o valor tabelado de K segundo a norma **ASTM E 691-99**.

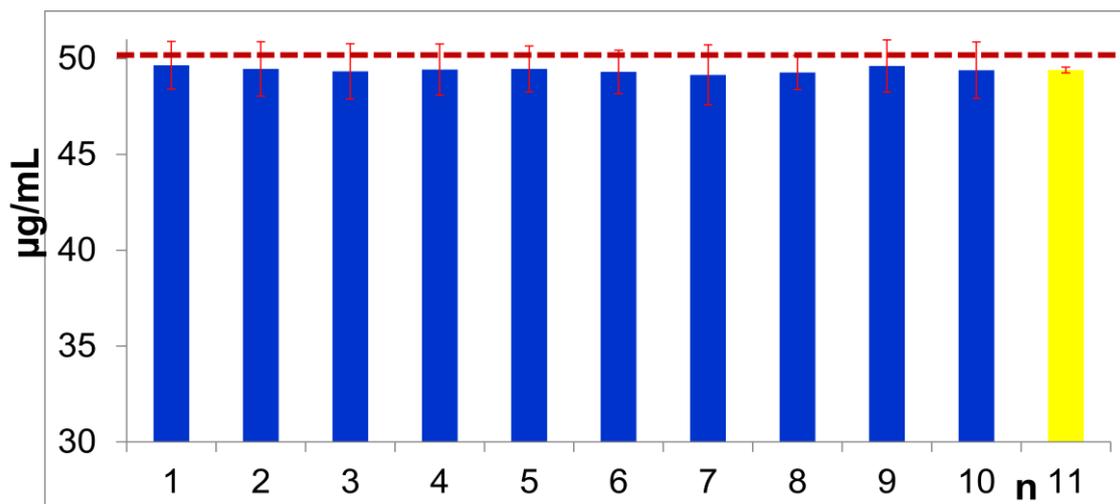


Figura 9: Repetitividade ($\pm s$) = 0,152 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 7 repetições, sendo o n=11 a média.

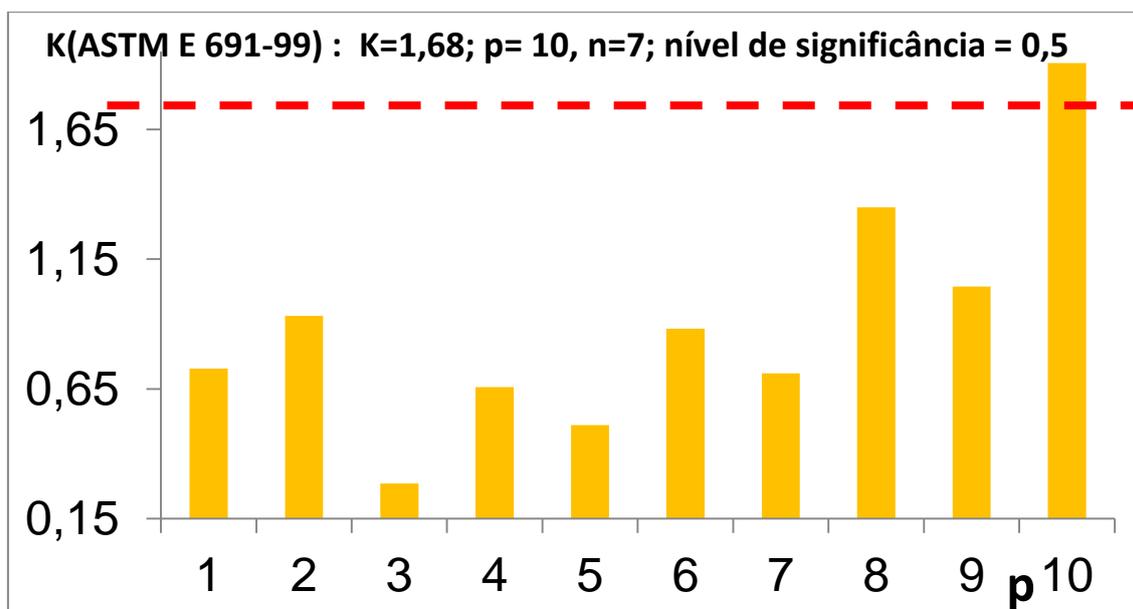


Figura 10: Precisão intermediária ($\pm sr$) = 0,450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para K tabelado da norma ASTM E 691-99.

3. 5. Robustez

O parâmetro robustez foi ensaiado considerando as variações do protocolo fatorial proposto por Yuden-Steiner variando-se concentrações de reagentes, volumes e tempo de reação como mostra o QUADRO 1. O tratamento estatístico aplicado para verificar se houve diferenças significativas entre os resultados obtidos comprovou que o método é robusto. Entretanto, em virtude de que o método necessita que o pH da

amostra permaneça no intervalo entre 10,0 e 10,4, não é possível ensaiar outras variações de pH.

	Combinações ensaiadas							
	1	2	3	4	5	6	7	8
(A) Mistura de Na ₂ CO ₃ 2%/CuSO ₄ 1% + Tarta. 2% (a) Mistura Na ₂ CO ₃ 1,8%/CuSO ₄ 0,8% + Tarta. 1,8%	A	A	A	A	a	a	a	a
(B) Tempo 10 min (b) Tempo 8 min	B	B	b	b	B	B	b	b
(C) Folin 0,2 mL (c) Folin 0,18 mL	C	c	C	c	C	c	C	c

Quadro 1: Ensaio de robustez com variações nas concentrações dos reagentes, diferentes tempos de espera e volumes diferentes.

3.6. Incerteza de medição

Para calcular a incerteza de medição foram levantadas todas as possíveis fontes de erros e suas subcausas na execução do método como mostra a figura 11. A incerteza é a combinação de todas as fontes de erros e essas fontes de incerteza são:

- Incerteza do fator de diluição;
- Incerteza da balança tendo como subcausas as sensibilidades da tara e da medição;
- Incerteza do balão volumétrico tendo como subcausas temperatura, calibração e enchimento;

- Incerteza das ponteiros do pipetador automático tendo como subcausas a ponteira de capacidade de 1000 μL (V1) e a ponteira de capacidade de 5000 μL , dados vindos do certificado;
- Incerteza da precisão e
- Incerteza da medição.

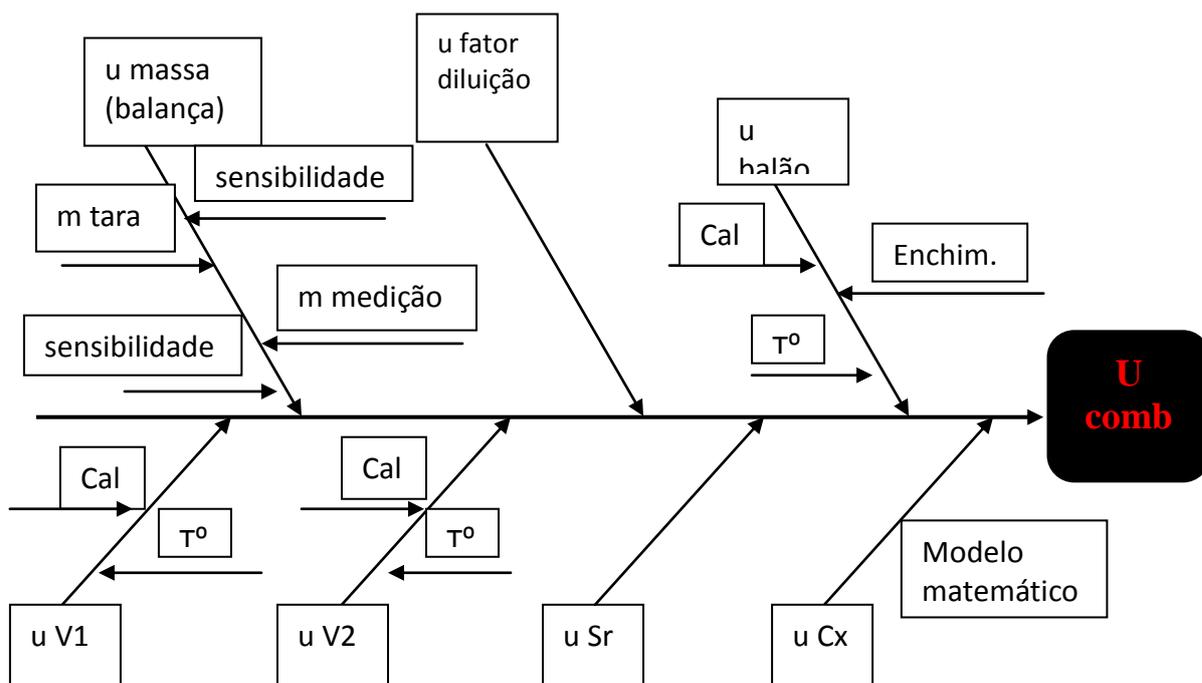


Figura 11: Diagrama de Ishikawa mostrando as causas e subcausas de fontes de erro.

Para o cálculo da estimativa da incerteza são feitos vários cálculos matemáticos e estatísticos. A figura 12 mostra a estimativa da incerteza da medição em relação à concentração e a figura 13 a incerteza combinada de todas as possíveis fontes de erro. A incerteza nas concentrações medianas é menor quando comparadas as concentrações dos extremos.

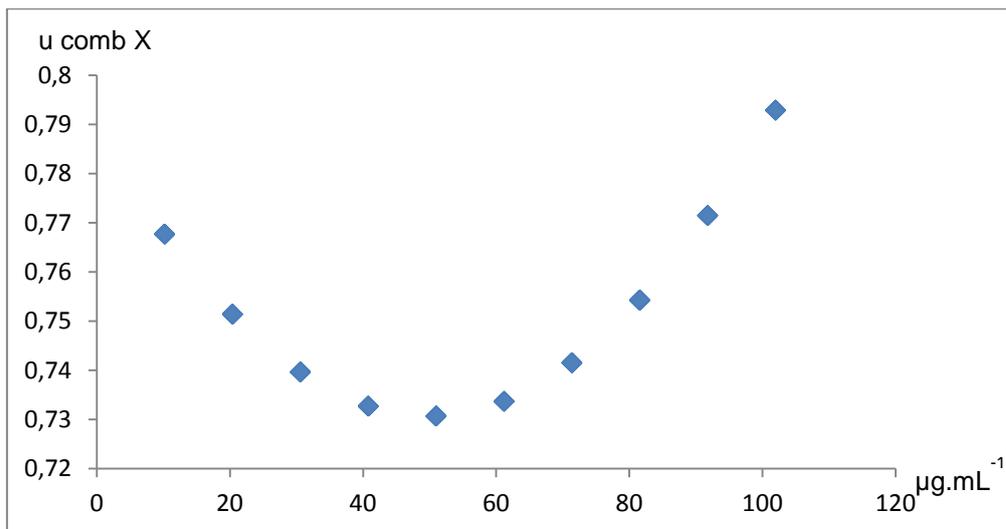


Figura 12: Estimativa da incerteza da medição X concentração.

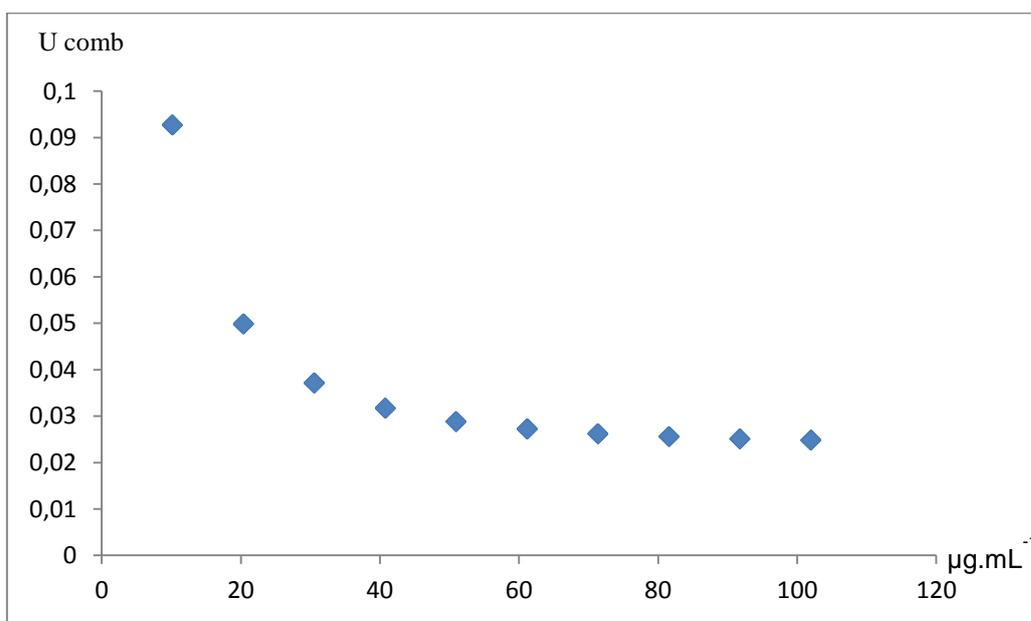


Figura 13: Incerteza combinada.

Nota-se que a incerteza combinada é maior nas menores concentrações, tornando-se praticamente constante a partir de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As causas que contribuem para a incerteza combinada nas diferentes concentrações não são sempre as mesmas. Nas concentrações menores o que mais contribui para a incerteza é a medição como mostra a figura 14. Na concentração mediana o que mais contribui é a balança, ou seja, incerteza da massa como mostra a figura 15, assim como nas concentrações superiores. Na maior concentração como mostra a figura 16, a maior fonte de incerteza é a balança

seguida da incerteza da precisão, o que está de acordo com o parâmetro analisado da validação, pois a precisão mostrou que a maior concentração não é precisa.

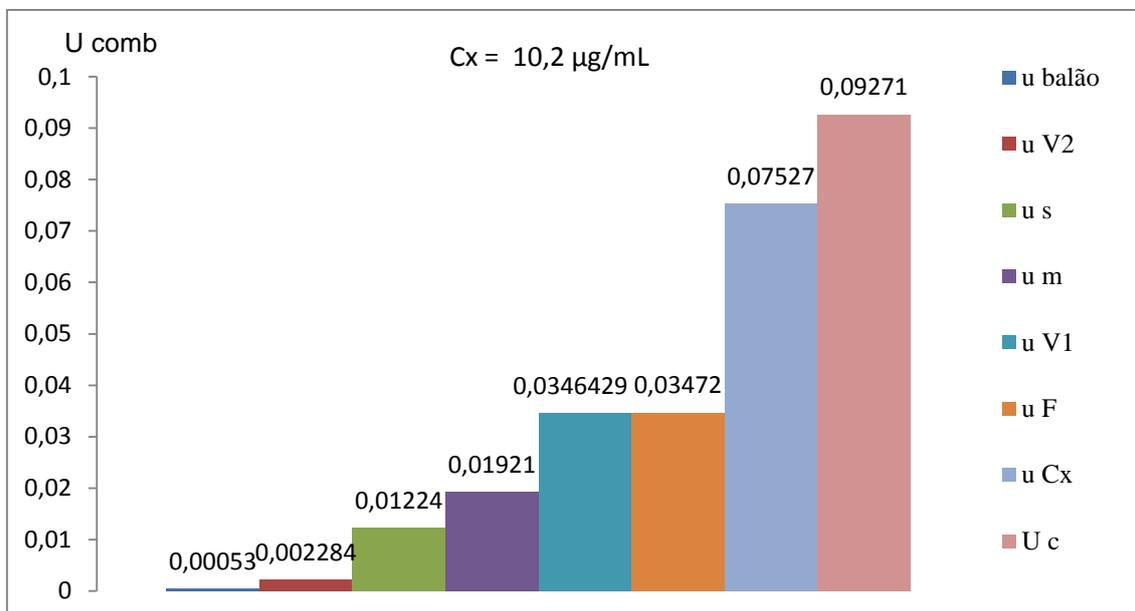


Figura 14: Incerteza combinada para concentração 10,2 µg.mL⁻¹.

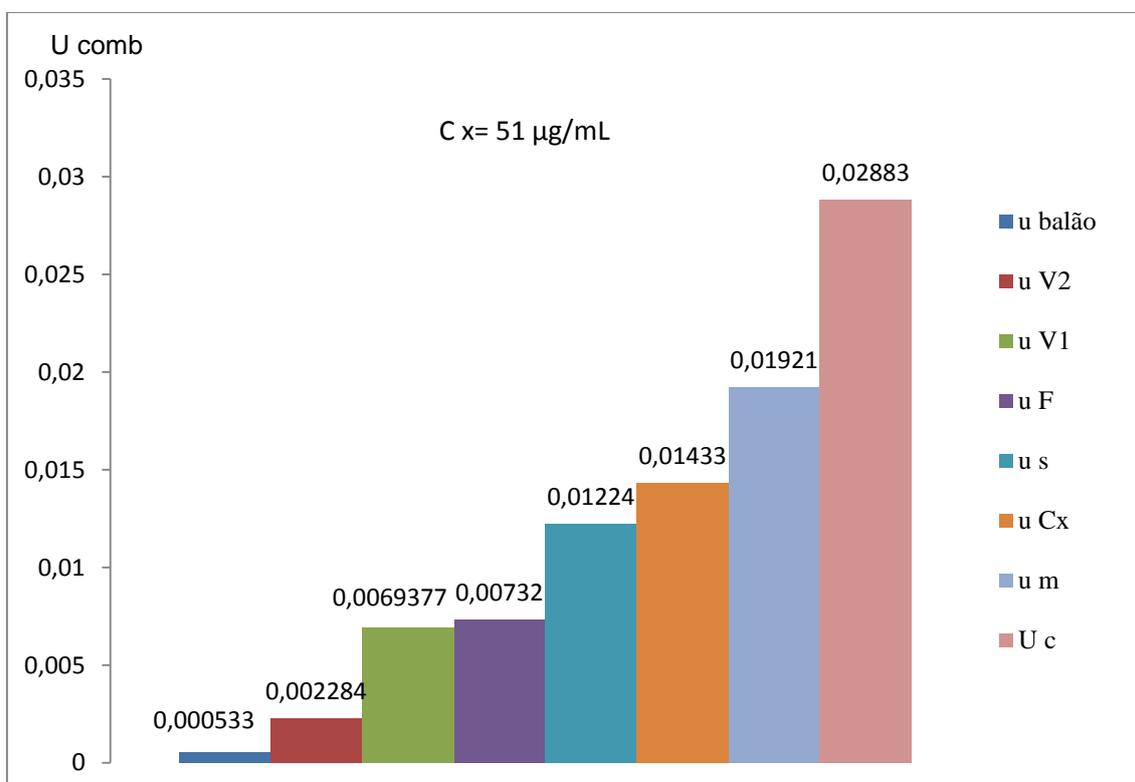


Figura 15: Incerteza combinada para concentração 51,0 µg.mL⁻¹.

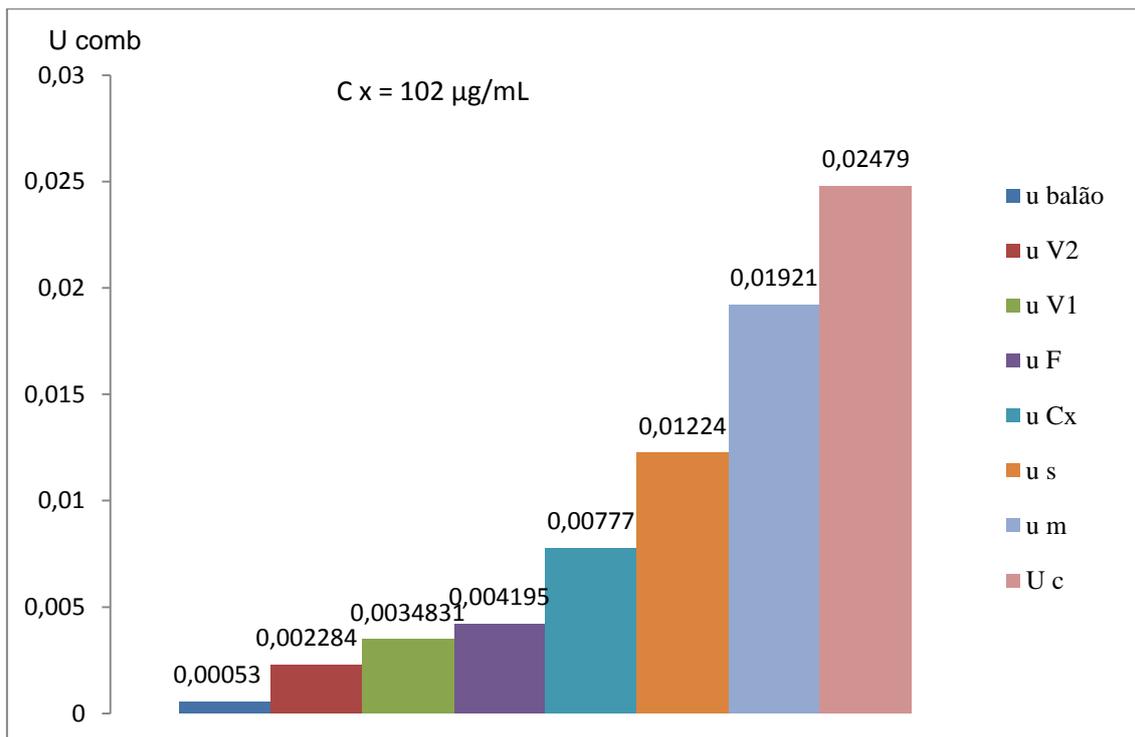


Figura 16: Incerteza combinada para concentração $102 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4. CONCLUSÕES

Apesar da existência de muitas técnicas modernas, o método espectrofotométrico tem demonstrado ser eficaz, além do custo mais baixo e do fácil manuseio.

O método modificado foi desenvolvido e validado. Os resultados obtidos permitem afirmar que o método modificado de Lowry tem os seguintes parâmetros de validação:

- Sensibilidade: $0,0046 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Linearidade: $10 - 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Precisão por repetitividade: $0,152 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Precisão intermediária: $0,450 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Faixa linear de trabalho: $20 - 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Limite de detecção: $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Limite de quantificação: $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Robustez: as variações não afetaram o resultado final
- Incerteza: a incerteza combinada mostra que o método apresenta incertezas maiores em concentrações até $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e, após essa concentração, a incerteza torna-se praticamente constante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTIGNAC, J. P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according do the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. **Analytica Chimica Acta**, v.483, p.325-334, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria número 50 de 20 de fevereiro de 2006. Aprova os programas de Controle de Resíduos em carne, leite, mel, ovos e pescado do exercício de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, 03 de março de 2006, seção 1, p.15.

ISO (International Standard Organization). ISO 9000. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. Geneva: ISO, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-276, 1951.

NATA. Technical Note 17. Format and contente of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. 1997.

TAVENIERS, I.; De LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535 – 552, 2004.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**. V.18, p.624-632, 1999.

ANEXO I

Determinação de Proteína pelo método de Lowry et al (1951).

Reagentes:

Reagente A: solução de Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 N

Reagente B: solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% e citrato de sódio 1%

Reagente C: no momento de usar misturar 50 mL do reagente A + 1 mL do reagente B

Reagente D: reagente de Folin Ciocalteu diluído com água deslitolada a 1:1

Tubo	BSA (μg)	Vol NaOH 0,1N - mL	Reagente C (mL)	Reagente D (mL)
1	0	1,0	5	0,5
2	10	0,9	5	0,5
3	20	0,8	5	0,5
4	30	0,7	5	0,5
5	40	0,6	5	0,5
6	50	0,5	5	0,5
7	60	0,4	5	0,5
8	80	0,2	5	0,5
9	100	0	5	0,5