



Instituto Federal de Brasília  
Campus Gama  
Curso Superior de Licenciatura em Química

BLENDA SILVA MADEIRA

# **VALIDAÇÃO QUÍMICA EM ESPECTROANALÍTICA PARA ANÁLISE DE MICONAZOL**

Brasília  
2017

BLENDA SILVA MADEIRA

## **VALIDAÇÃO QUÍMICA EM ESPECTROANALÍTICA PARA ANÁLISE DE MICONAZOL**

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura em Química do *Campus Gama* do Instituto Federal de Brasília como requisito parcial para obtenção de título de Licenciado em Química.

Orientador: Jefferson Saraiva de Oliveira

Brasília  
2017

BLENDA SILVA MADEIRA

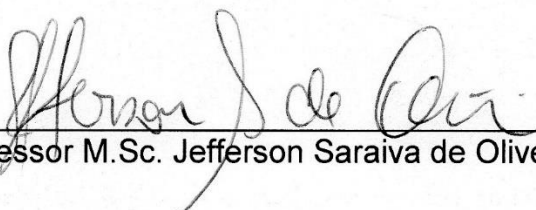
## VALIDAÇÃO QUÍMICA EM ESPECTROANALÍTICA PARA ANÁLISE DE MICONAZOL

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura em Química do *Campus Gama* do Instituto Federal de Brasília como requisito parcial para obtenção de título de Licenciado em Química.

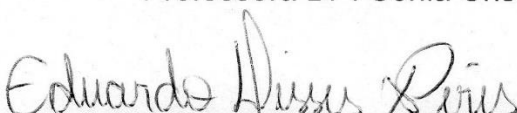
Orientador: Jefferson Saraiva de Oliveira

Aprovado em: 20 de dezembro de 2017

### BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Professor M.Sc. Jefferson Saraiva de Oliveira – Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Professora Dr<sup>a</sup>. Sonia Cristina Hamid

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Eduardo Ulisses Xavier Peres

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por tudo que tem me proporcionado ao longo da vida e por fazer possível essa conquista. Aos meus pais, que são a minha base, pelo apoio durante essa trajetória e por me ensinarem a sempre acreditar e lutar por meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua fidelidade me permitindo alcançar essa vitória me sustentando em todos os momentos.

Aos meus pais, James e Juceny, pelas orações, palavras de incentivo e consolo, por me ensinarem a sempre lutar por meus objetivos e por todo amor demonstrado ao longo de toda a minha vida.

Ao meu noivo Raul pelo amor, paciência e incentivo ao longo de todos esses anos e principalmente no meu ano de formação.

Aos meus amigos, que ao longo dessa jornada, se fizeram presentes tornando essa trajetória mais feliz.

Ao meu orientador Jefferson pela atenção, paciência e por estar continuamente me auxiliando ao longo do projeto.

A todos os meus professores pela contribuição em meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Instituto Federal de Brasília- *Campus Gama* por toda a infraestrutura disponibilizada.

A todos os meus colegas de curso no qual compartilhei alegrias e aflições ao longo desses anos de estudo.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

## RESUMO

A calibração é uma prática conhecida quando se utilizam técnicas instrumentais de análise para determinar a concentração por meio da relação com outra grandeza. Após a calibração é feita a validação, a qual deve garantir que o método cumpra as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados. Na literatura diversos trabalhos trazem descritas metodologias para a validação de métodos analíticos em diferentes seguimentos, contudo nota-se a falta de materiais que façam uma transposição didática e que auxiliem a aprendizagem do conteúdo de validação em espectroscopia para o ensino técnico em química. Desse modo, este trabalho, teve como objetivo desenvolver a validação analítica espectroscopia UV-Vis por meio de análise de fármaco, mais especificamente o miconazol. Os padrões de calibração foram preparados a partir do princípio ativo do nitrato de miconazol. Selecionaram-se três pomadas de nitrato de miconazol de diferentes laboratórios para o preparo das amostras. As curvas de calibração para o método de padrão externo e padrão interno foram preparadas a partir de uma solução estoque de miconazol 40 mg/L em metanol PA, obtendo diluições de concentrações de 3,2; 6,4; 8,0; 9,6; 14,4 e 16,0 mg/L para cada método. Para o método padrão interno foi preparado uma solução estoque de azul de metileno 264 mg/L e adicionou-se 1 mL em cada diluição. Para cada um dos métodos foram preparadas duplicatas das amostras de pomada 10 mg/L em metanol PA para os três laboratórios. Nas amostras de pomada de padrão interno foram adicionadas 4 mL da solução de azul de metileno. A curva de calibração de padrão externo foi preparada a partir de uma solução estoque de miconazol 30 mg/L em metanol PA e uma solução de amostra de pomada para cada laboratório, obtendo-se diluições de concentrações de 0; 1,2; 2,4; 4,8; 6,0; 7,2; e 10,8 mg/L. As análises do UV-Vis foram realizadas em triplicadas no comprimento de onda entre 200 e 800 nm. Os parâmetros como linearidade, exatidão, precisão e limite de detecção foram determinados conforme as especificações exigidas da ANVISA e do INMETRO. A linearidade pode ser confirmada pelo coeficiente de correlação: 0,8666- Padrão externo; 0,9676 ( $ABS_{206}/ABS_{291}$ ), 0,9779 ( $ABS_{206}/ABS_{653}$ ) - Padrão interno; 0,9195; 0,9685 e 0,9676 - Adição padrão. A análise de variância e o teste da significância da regressão para padrão externo indicou que o ajuste do modelo é satisfatório a um nível de confiança de 95%. Seu limite de detecção foi de 0,0103. O método padrão externo apresentou dois valores de exatidão dentro da faixa de 80-120% sendo eles de 97,83%; 107,41%. O método de padrão interno demonstrou ser preciso, pois os valores de coeficiente de variação obtidos (4,04%; 4,1% e 3,7%) e (2,25%; 2,72% e 2,45%) foram inferiores a 5%. A partir do desenvolvimento da validação analítica e dos resultados foi possível sistematizar um roteiro experimental que abrangesse de maneira simplificada a validação analítica utilizando o método espectrofotométrico na região do UV-Vis.

**Palavras-chave:** Métodos de validação. UV-Vis. Calibração.

## ABSTRACT

The calibration is a known practice when instrumental analysis techniques are used to determine the concentration by means of the relation with another measure. After calibration, the validation is performed, which must ensure that the method meets the requirements of the analytical applications, ensuring the reliability of the results. In the literature, several studies have described methodologies for the validation of analytical methods in different segments, but the lack of materials that do a didactic transposition and that helps the learning of the content of validation in spectroscopy for the technical teaching in chemistry. Thus, this work aimed to develop analytical validation UV-Vis spectroscopy by means of drug analysis, more specifically miconazole. The calibration standards were prepared from the miconazole nitrate active principle. Three miconazole nitrate ointments from different laboratories were selected for the preparation of the samples. The calibration curves for the external standard method and internal standard were prepared from a stock solution of 40 mg/L miconazole in methanol PA, obtaining dilutions of concentrations of 3,2; 6,4; 8,0; 9,6; 14,4 and 16,0 mg/L for each method. For the standard internal method a stock solution of methylene blue 264 mg/L was prepared and 1 mL was added in each dilution. For each of the methods duplicates of 10 mg/L ointment samples were prepared in methanol PA for the three laboratories. In the internal standard ointment samples were added 4 mL of the methylene blue solution. The external standard calibration curve was prepared from a stock solution of 30 mg/L miconazole in methanol PA and a sample solution of ointment for each laboratory, obtaining dilutions of concentrations of 0; 1,2; 2,4; 4,8; 6,0; 7,2; and 10,8 mg/L. UV-Vis analyzes were performed in triplicates at the wavelength between 200 and 800 nm. The parameters such as linearity, accuracy, precision and limit of detection were determined according to the required specifications of ANVISA and INMETRO. The linearity can be confirmed by the correlation coefficient: 0,8666 - External standard; 0,9676 ( $ABS_{206} / ABS_{291}$ ), 0,9779 ( $ABS_{206} / ABS_{653}$ ) - Internal standard; 0,9195; 0,9685 and 0,9676 - Standard addition. The analysis of variance and the regression significance test for the external standard indicated that the fit of the model is satisfactory at a 95% confidence level. Its detection limit was 0,0103. The external standard method presented two values of accuracy within the range of 80-120% being 97.83%; 107.41%. The internal standard method proved to be accurate, since the coefficient of variation values obtained (4,04%, 4,1% and 3,7%) and (2,25%, 2,72% and 2,45%) were less than 5%. From the development of the analytical validation and the results it was possible to systematize an experimental roadmap which covers in a simplified way the analytical validation using the spectrophotometric method in the UV-Vis region.

**Keywords:** Validation methods. UV-Vis. Calibration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química do imidazol (A) e do triazol (B) .....	24
Figura 2- Estrutura do miconazol .....	25
Figura 3- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque colocadas em balões de 25 mL para a calibração.....	29
Figura 4- Esquema da solução de amostra preparada em duplicata para cada marca comercial de pomada .....	30
Figura 5- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque colocadas em balões de 25 mL e de alíquotas de azul de metileno adicionadas para a calibração .....	31
Figura 6- Esquema da solução de amostra preparada em duplicata para cada marca comercial de pomada adicionando-se a solução de azul de metileno.....	32
Figura 7- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque padrão de miconazol para as respectivas soluções de trabalho .....	33
Figura 8- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque de cada marca comercial de pomada para as respectivas soluções de trabalho que continham o padrão de miconazol.....	34
Figura 9- Espectro de absorção no UV- Vis do miconazol e do azul de metileno em solução de metanol .....	36
Figura 10- Espectro de absorção no UV- Vis das amostras de pomadas .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados .....	23
Tabela 2- Curva de calibração para o Padrão externo .....	38
Tabela 3- Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida .....	39
Tabela 4- Valores de absorbancia e $\gamma_{\text{estimado}}$ para as amostras de diferentes laboratórios pelo método de padrão externo .....	39
Tabela 5- Curva de calibração de Padrão interno de $ABS_{206}/ABS_{291}$ e de $ABS_{206}/ABS_{653}$ .....	41
Tabela 6 - Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para padrão interno no conjunto de amostras $ABS_{206}/ABS_{291}$ .....	42
Tabela 7- Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para padrão interno no conjunto de amostras $ABS_{206}/ABS_{653}$ .....	42
Tabela 8- Conjunto de amostras $ABS_{206}/ABS_{291}$ com seus respectivos $\gamma_{\text{estimado}}$ .....	43
Tabela 9- Conjunto de amostras $ABS_{206}/ABS_{653}$ com seus respectivos $\gamma_{\text{estimado}}$ .....	43
Tabela 10- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratorio Geolab .....	45
Tabela 11- Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Geolab por adição padrão.....	46
Tabela 12- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratorio Teuto .....	47
Tabela 13- Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Teuto por adição padrão .....	48
Tabela 14- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratorio Pranti-donaduzzi.....	49
Tabela 15- Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Pranti-donaduzzi por adição padrão. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coeficiente de variação
GEPEC	Grupo de Pesquisa em Educação Química
IQ-UNB	Instituto de Química- Universidade de Brasília
IQ-USP	Instituto de Química- Universidade de São Paulo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LP	Limite de detecção
PA	Para análise
PEQS	Projeto de Ensino de Química em um Contexto Social
RSP	Desvio Padrão relativo
UV-VIS	Ultravioleta- Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Validação.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Calibração.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>UV-Vis.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Fármaco Miconazol.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Ensino técnico em química.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Materiais didáticos.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E METÓDOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Material Padrão (Miconazol).....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Material das amostras (Pomadas).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Elaboração do roteiro.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparo dos padrões e as amostras.....</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise espectrofotométricas no UV-Vis.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Validação do método analítico.....</b>	<b>34</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Espectros de absorção no UV-Vis.....</b>	<b>36</b>

<b>5.2</b>	<b>Padrão Externo.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Padrão Interno.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4</b>	<b>Adição Padrão.....</b>	<b>44</b>
<b>5.5</b>	<b>Roteiro.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é uma propriedade determinada por meio da relação com outra grandeza como a absorção ou emissão de luz, essa prática é conhecida como calibração<sup>1</sup>. Nesse processo são estabelecidas uma série de operações, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente<sup>2</sup>. Após a calibração é feita a validação, onde nesta etapa, as variáveis independentes obtidas, para outro conjunto de amostras, são utilizadas em conjunto com o coeficiente de regressão, para calcular os valores previstos para a variável dependente<sup>3</sup>.

A validação analítica de um método é um processo que prova se o mesmo é aceitável para o propósito a qual que se destina. Ela deve garantir que o método cumpra as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados<sup>4</sup>. Com isto nota-se a sua importância tanto para o meio acadêmico como também para empresas e órgãos reguladores.

A literatura dispõe de inúmeros trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e que descrevem a metodologia a ser seguida durante o desenvolvimento do mesmo em diversas áreas como a biologia, farmacêutica e química. Entretanto, nota-se a falta de materiais que faça uma transposição didática do conteúdo a ser abordado e que assim auxilie a aprendizagem do conteúdo de validação em espectroscopia, o qual é ministrado na disciplina de análise instrumental, para o ensino técnico em química.

Os materiais didáticos são instrumentos mediadores que contribuem para a construção de uma aprendizagem significativa<sup>5</sup>. Sendo assim, um material didático deve conter características como ter um bom texto didático, figuras e desenhos adequados ao texto, além de uma linguagem adequada para o tipo de público alvo<sup>6</sup>. Um roteiro experimental é um material didático que deve apresentar uma estrutura adequada para se obter os objetivos desejados. Ele pode ser classificado em laboratório formal ou de verificação, laboratório aberto-fechado, baseado num problema e investigatório.

Desta forma, o presente trabalho objetivou-se a preencher a lacuna acerca da validação analítica em espectroscopia por meio de análise de fármaco, mais especificamente o miconazol.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

Desenvolver a validação analítica, em espectroscopia, empregando a análise de fármaco.

### ***2.1 Objetivos específicos***

- Analisar o fármaco miconazol;
- Validar a análise espectroscópica;
- Sistematizar um material didático de simples compreensão;

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Validação

A qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Assim para garantir que um novo método analítico obtenha informações confiáveis sobre a amostra ela deve sofrer uma avaliação denominada de validação, uma vez que, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis<sup>7</sup>.

Na literatura estão dispostos diversos conceitos de validação de métodos, entre eles: A validação pode ser definida como exigência analítica para confirmar que o método desenvolvido tem capacidade de desempenho consistente, garantindo a confiabilidade de metodologias analíticas<sup>8</sup>; A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer”<sup>9</sup>. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados<sup>4</sup>.

A validação tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos<sup>4</sup>.

Vários trabalhos já foram desenvolvidos a respeito de validação de métodos analíticos, descrevendo definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos<sup>7</sup>. Desenvolvimento e da validação de um novo método para a quantificação do ácido fólico utilizando a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta<sup>8</sup>. Desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato<sup>10</sup>; Análise dos principais aspectos da validação de métodos analíticos na quantificação do captopril<sup>11</sup>.

Na área de análises de alimentos, a validação de métodos está principalmente associada com segurança alimentar e comércio internacional<sup>8</sup>. Os resultados provenientes dos métodos de ensaio muitas vezes subsidiam a

elaboração de políticas de saúde pública para melhoramento da qualidade dos alimentos disponibilizados à população e adequação do país, principalmente do ponto de vista sanitário em concordância com as exigências do comércio internacional<sup>12</sup>.

A área de medicamentos vem sendo cada vez mais objetos de preocupação e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente<sup>13</sup>. O uso do medicamento como forma de competição pelo setor farmacêutico tem se tornado abusivo, mas o avanço do medicamento genérico mantém o mercado mais equilibrado e com o uso mais racional dos medicamentos fornecendo, assim, ao consumidor um medicamento de mesma qualidade e menor custo<sup>14</sup>.

Por tais razões, é de enorme importância o desenvolvimento de métodos eficazes e rápidos para maior controle de qualidade dos medicamentos comercializados, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de rotinas de análises que, além de servirem para este propósito, favoreçam sua implantação em comparação aos métodos usuais<sup>13</sup>.

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional<sup>7</sup>. Diante das exigências feitas pelos órgãos reguladores, além dos aspectos técnicos e comerciais, os laboratórios que realizam análises químicas devem se submeter a um credenciamento junto às agências credenciadoras, como a agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)<sup>12</sup>. Tais órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003<sup>4</sup> e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/ 2003<sup>15</sup>.

Os estudos de validação devem ser representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados assim os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método e o objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que o método será utilizado. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez<sup>7</sup>.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Em um método instrumental de separação a seletividade é a capacidade de avaliar as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Ela avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes<sup>7</sup>. Garantindo assim que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse<sup>9</sup>. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas<sup>15</sup>.

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais<sup>15</sup>.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação<sup>16</sup>.

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente  $y$ , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente  $x$ , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração<sup>17</sup>. O ajuste de uma equação linear por um conjunto de  $N$  pontos experimentais implica na determinação dos parâmetros  $a$  e  $b$  da equação<sup>18</sup>.

$$y = ax + b \quad (1)$$

Em que:  $y$  = resposta medida;  $x$  = concentração;  $b$  é o intercepto (o valor de  $y$  quando  $x$  for zero);  $a$  é a inclinação da linha.

Inclinação<sup>19</sup>:

$$a = \frac{N(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (2)$$

Intercepção<sup>19</sup>:

$$b = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xiyi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (3)$$

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre  $-1 \leq r \leq 1$ , sendo que quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva de calibração<sup>17</sup>. Porém mesmo com valores altos de r, próximos de 1, abaixo de 0,999, é possível que a regressão não seja linear<sup>20</sup>, o qual deve ser verificado com os testes estatísticos de comparação de variâncias<sup>21</sup>.

O cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente<sup>7</sup>. A inspeção de gráficos de resíduo em função de massa ou concentração pode auxiliar o usuário a estabelecer a faixa linear dos seus dados<sup>22</sup>.

A precisão é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medições. As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade<sup>15</sup>. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s)<sup>7</sup>.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

Onde,  $\bar{x}$  é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de  $\mu$ , a média verdadeira (média da população); xi é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável<sup>7</sup>, calculada pela equação:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Em que:  $t$  = valor crítico da distribuição de Student com  $n-1$  graus de liberdade. O valor  $t$  é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança. Onde  $\bar{x}$  = média para  $N$  réplicas e  $s$  = desvio padrão dos resultados obtidos a partir da curva de calibração.

O desvio padrão dos resultados obtidos a partir da curva de calibração é calculado da seguinte maneira<sup>23</sup>:

$$s = \frac{s_r}{a} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{a^2 S_{xx}}} \quad (6)$$

Onde  $S_r$  = desvio padrão da regressão;  $a$  é a inclinação da linha;  $M$  = quantidade das réplicas de análise amostras desconhecidas;  $N$  = número de pontos;  $\bar{y}_c$  = média de um conjunto  $M$  de réplicas;  $\bar{y}$  = Média para os  $N$  pontos de calibração;  $S_{xx}$  = Soma dos quadrados dos desvios em relação a média para valores individuais de  $x$ .

$$s = \frac{s_r}{a} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(0 - \bar{y})^2}{a^2 S_{xx}}} \quad (7)$$

Desvio padrão da regressão ( $S_r$ ) é dado da seguinte maneira<sup>23</sup>:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - a^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (8)$$

$$\text{Onde: } S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 \quad (9)$$

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (10)$$

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV)<sup>7</sup>.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (11)$$

A reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos<sup>24</sup>.

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo

laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos<sup>15</sup>.

Exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. Pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz limpa da amostra ou ainda na matriz da amostra<sup>25</sup>. 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<sup>4</sup>.

$$R(\%) = \frac{\bar{x} \cdot 100}{x} \quad (12)$$

Onde, R(%) é a porcentagem de recuperação;  $\bar{x}$  é a medida dos valores que foram determinados experimentalmente;  $x$  é a concentração teórica correspondente.

O limite de detecção refere-se a menor quantidade do item a ser analisado capaz de ser detectada com satisfatório grau de certeza (Equação 11). E limite de quantificação refere-se a menor quantidade deste item capaz de ser quantitativamente determinada com graus de precisão e exatidão aceitáveis. Uma vez que o método passou pela etapa de linearidade, pode ser considerado suficientemente sensível para detectar o analito na menor concentração na faixa linear. Desta forma, determinar o limite de detecção e quantificação consiste em um refino justificável apenas em casos mais específicos<sup>26</sup>.

$$LD = \frac{kS_B}{m} \quad (13)$$

Onde, k= fator de confiança= 2 (92,1% de confiança) ou 3 (98,0% de confiança);  $S_B$ = desvio padrão do branco; m= sensibilidade da calibração<sup>27</sup>.

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, e sua estimativa depende do tipo de metodologia analítica utilizada<sup>7, 4, 15, 17</sup>.

### 3.2 Calibração

A medida quantitativa de uma propriedade de interesse em um sistema químico é uma das práticas mais frequentes em química analítica. Na grande maioria dos casos, essa propriedade trata da concentração de uma espécie presente no meio<sup>28</sup>. Quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é uma propriedade determinada indiretamente por meio da relação com outra grandeza, como a absorção ou emissão de luz, esta prática é conhecida como calibração<sup>1</sup>.

Logo, calibração em química analítica é a operação que determina a relação funcional entre valores medidos e grandezas analíticas caracterizando os tipos de analitos e suas quantidades ou concentrações. A calibração inclui a seleção do modelo, a estimativa dos parâmetros do modelo e dos erros associados a essas estimativas, e a validação do modelo<sup>1</sup>.

O processo de calibração pode ser definido como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e os valores correspondentes à propriedade de interesse realizados em padrões<sup>1</sup>.

Entre os métodos de calibração existentes os mais difundidos são os métodos univariados, onde se tem apenas uma medida instrumental para cada uma das amostras de calibração. A aplicação de modelos univariados é restrita a situações em que a grandeza que é medida diretamente no sistema é livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação linear com a propriedade de interesse. E métodos de calibração multivariada, onde duas ou mais respostas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes. Isso faz com que, modelos de Calibração Multivariada sejam uma alternativa quando métodos univariados não podem ser aplicados<sup>28</sup>.

Quando se deseja construir uma curva de calibração costuma-se fazer a suposição de que a curva deve passar o mais perto possível dos pontos experimentais. O modo mais empregado de obter essa máxima proximidade é o método dos mínimos quadrados<sup>29</sup>.

No uso do método dos mínimos quadrados são feitas duas considerações. A que existe uma relação linear entre a resposta medida  $y$  e a concentração analítica

do padrão  $x$ . Essa relação matemática é denominada modelo de regressão e é representado pela Equação 1. Também se considera que qualquer desvio de pontos individuais da linha reta é decorrente de erros na medida<sup>27</sup>.

Em uma calibração com padrão externo, um padrão externo é preparado separadamente da amostra. Em contraste, um padrão interno é adicionado à própria amostra. Padrões externos são utilizados para calibrar instrumentos e procedimentos quando não há efeito de interferência de componentes da matriz da solução do analito. A calibração é realizada obtendo-se um sinal de resposta como uma função da concentração conhecida do analito. Uma curva de calibração é montada ajustando os dados por meio de uma equação matemática adequada, como a relação linear utilizada no método dos mínimos quadrados<sup>27</sup>.

Em uma calibração com padrão interno, uma quantidade de espécie que atua como referência é colocada em todas as amostras, padrões e brancos. Logo, o sinal da resposta não é aquele próprio do analito, mas sim da razão entre o sinal do analito e o da espécie de referência. Uma curva de calibração é preparada onde o eixo  $y$  é a razão entre as respostas e o eixo  $x$  a concentração do analito nos padrões<sup>27</sup>.

Para uma calibração utilizando o método de adição padrão, são feitas as adições de quantidades conhecidas da solução padrão do analito a várias porções da amostra e assim é obtida uma curva de calibração com múltiplas adições. O método de adições múltiplas permite verificar se existe uma relação linear entre a resposta e a concentração do analito<sup>27</sup>.

O processo de calibração normalmente consiste em duas etapas. A etapa descritiva onde medidas feitas numa série de padrões analíticos de concentrações conhecidas são usadas para construir um modelo relacionando à concentração a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse. E a etapa preditiva onde usa-se esse modelo para prever as concentrações de novas amostras a partir dos sinais analíticos medidos para elas<sup>29</sup>.

Ao utilizar uma curva de calibração para prever o valor da concentração a partir de uma resposta analítica medida com certo erro associado, tem-se uma regressão inversa<sup>29</sup>.

A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio de Análise da Variância conforme a Tabela 1. As expressões

ajustadas na tabela se aplicam ao ajuste, por meio dos mínimos quadrados de um modelo geral com  $p$  parâmetros<sup>29</sup>.

Tabela 1- Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte	Soma Quadrática	G.L	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p-1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$n-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum [y_{ij} - y_m]^2$	$n-1$	

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática;  $n_i$  = número de repetições do nível  $i$ ;  $m$  = número de níveis distintos da variável  $x$ ;  $n = \sum n_i$  = número total de medidas;  $p$  = número de parâmetros do modelo. O índice  $i$  indica o nível da variável  $x$ ; o índice  $j$  refere-se às medidas repetidas da variável  $y$  em um dado nível de  $x$ . O segundo somatório das expressões para  $SQ_r$ ,  $SQ_{ep}$  e  $SQ_t$  vai de  $j = 1$  até  $j = n_i$ . Os outros somatórios vão de  $i = 1$  até  $i = m$ .  $y_m$  é a média de todos os valores de  $y$ ;  $y_{im}$  é a média das determinações repetidas no nível  $i$ .

Pode-se verificar se o ajuste do modelo é satisfatório:

$$\frac{MQ_{falta\ de\ ajuste}}{MQ_{erro\ puro}} < F_{v_{falta\ de\ ajuste}; v_{erro\ puro}} \quad (14)$$

E se o modelo for linear:

$$\frac{MQ_{regressão}}{MQ_{residual}} \gg F_{v_{regressão}; v_{residual}} \quad (15)$$

### 3.3 UV-Vis

A espectrometria de absorção molecular nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível é largamente utilizada para a determinação quantitativa de um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas<sup>23</sup>. A espectroscopia na região do UV-VIS está associada às transições eletrônicas, nas quais elétrons são promovidos de um estado de mais baixa energia para outro mais energético<sup>30</sup>.

A determinação qualitativa e quantitativa de cada constituinte de uma amostra é uma tarefa muito laboriosa ao se usar a espectrofotometria UV-VIS. Devido às bandas de absorção se apresentarem muito alargadas, sobrepostas e carentes de

detalhes, torna-se muito complexa e de difícil interpretação uma análise qualitativa da amostra<sup>31</sup>.

A espectrometria de absorção molecular é baseada na medida da transmitância  $T$  ou da absorbância  $A$  de soluções contidas em células transparentes com caminho óptico de  $b$  cm. Geralmente, a concentração de um analito que absorve radiação está relacionada com a absorbância, e pode ser determinada a partir da lei de Lambert- Beer<sup>23</sup>:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{p} = \epsilon bc \quad (16)$$

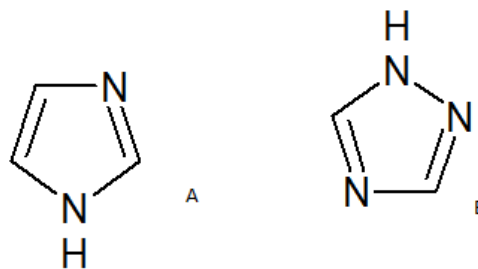
A espectroscopia UV-Vis apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira escolha. Trata-se de uma técnica consolidada, de baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e alimentícios<sup>8</sup>.

### 3.4 Fármaco Miconazol

Nas últimas décadas, nota-se um aumento exponencial das infecções fúngicas. Esta evolução deve-se a vários fatores: avanço nas ciências médicas, aumento do número de pacientes imunodeprimidos e aparecimento de resistências aos antifúngicos<sup>32</sup>.

Os azóis são compostos fungistáticos de origem sintética que se caracterizam por possuir um imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos por ligações C-N. A natureza dos outros anéis modifica as propriedades físico-químicas, o efeito terapêutico e a toxicidade dos compostos. Podem ser classificados em imidazóis e triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol<sup>33</sup>.

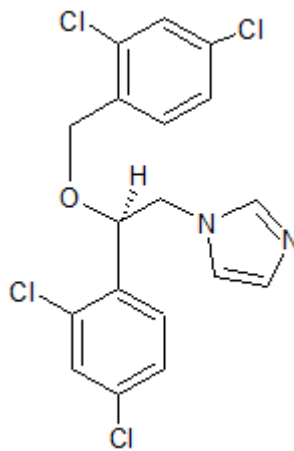
Figura 1 - Estrutura química do imidazol (A) e do triazol (B)



Fonte: Elaborado pelo autor

O miconazol ( $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ ) é um derivado de imidazol, com ação antifúngica de amplo espectro ativo pelas vias sistêmica e tópica, para uso dermatológico/tópico. O miconazol combina a atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras comuns e outros fungos, como *Malassezia furfur* e também com atividade contra certas bactérias cocos gram-positivas. Este fármaco inibe a biossíntese do ergosterol no fungo e altera a composição de outros componentes lipídicos da membrana, causando ruptura da mesma, e consequente morte da célula fúngica<sup>34</sup>.

Figura 2 - Estrutura do miconazol



Fonte: Elaborado pelo autor

O ergosterol é o maior componente da membrana celular fúngica e é essencial na biorregulação da fluidez, assimetria e integridade da membrana celular. Por isso, é o alvo principal dos azóis e também das alilaminas<sup>35</sup>.

O miconazol é usado na forma de nitrato. O nitrato de miconazol ( $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$ ) loção cremosa age rapidamente nas infecções por dermatófitos, leveduras e outros fungos, não produzindo níveis sanguíneos detectáveis, portanto sua ação é exclusivamente local<sup>34</sup>.

O miconazol pode ser utilizado no tratamento curativo e profilático das candidoses da cavidade bucofaríngea, e do trato gastrintestinal e também utilizado no tratamento de vulvovaginites e dermatomicoses<sup>36</sup>.

### 3.5 Ensino técnico em Química

Com o surgimento da indústria química no Brasil viu-se a necessidade de mão de obra qualificada para este setor industrial. Desta forma surgiu o ensino

técnico em química proporcionando a formação profissional na área de química de forma mais rápida, com menores custos e que viesse suprir a escassez de profissionais neste ramo<sup>37</sup>. De acordo com Siqueira apud Matsumoto & Kuwabara:

O ensino técnico-químico foi estabelecido com o Instituto de Química, fundado no Rio de Janeiro, em 1918, que previa de um lado cursos científicos, destinados a formar químicos profissionais e, de outro, os cursos abreviados, destinados a pessoas que desejam aplicar os conhecimentos na indústria ou no comércio. Nessa mesma época a Escola Politécnica de São Paulo criou o curso de químicos<sup>38</sup>.

Nota-se que o programa de formação profissional do técnico em química e do ensino superior em química possui praticamente o mesmo conteúdo, o que se difere é o tempo destinado para tratar de cada conteúdo e a importância de cada assunto para cada um dos níveis de ensino. Os conteúdos são distribuídos nas disciplinas de Química Geral, Química Orgânica, Química Inorgânica, Química Analítica e Físico-Química. Dentre a disciplina de Química analítica pode-se pontuar a análise instrumental<sup>37</sup>.

### **3.6 Materiais didáticos**

As pesquisas em Ensino de Química vêm produzindo conhecimento e dando suporte ao planejamento de cursos que favorecem, por parte dos alunos, a produção de conhecimentos significativos não apenas sobre o conteúdo das disciplinas científicas como também sobre o processo de construção da própria ciência. Assim, as práticas pedagógicas se efetivam, em sala de aula e nos laboratórios de ensino, com o uso de diferentes recursos didáticos como textos escritos dos mais variados gêneros, imagens e softwares<sup>39</sup>.

O ensino de forma significativa estabelece o ensino como um processo mais complexo do que apenas a transmissão e recepção de conhecimento. Instrumentos mediadores que podem contribuir bastante para construir uma aprendizagem significativa são os livros didáticos escolares de Química<sup>5</sup>. Contudo, nem sempre os livros pelos quais os alunos estudam são facilitadores dessa construção, nem apresentam uma imagem correta e integrada do que a ciência produz<sup>40</sup>. Entretanto, o material a ser utilizado deve proporcionar ao aluno o estímulo à pesquisa e a busca de novos conhecimentos<sup>41</sup>.

Os professores em processo de formação profissional normalmente se queixam da rigidez dos materiais didáticos disponíveis, o que dificulta a sua utilização em certas estratégias de ensino. Por vezes, o professor se recusa a adotar fielmente os manuais didáticos do mercado e faz adaptações tentando moldá-los à sua realidade escolar e convicções pedagógicas<sup>6</sup>.

No campo de Ensino de Química, há histórica preocupação dos pesquisadores com a produção de materiais didáticos alternativos à esfera comercial e aos modelos convencionais dessa esfera<sup>42</sup>. Com isto há a alguns anos grupos de parcerias entre professores universitários e professores do ensino básico de química como o GEPEC (Grupo de Pesquisa em Educação Química) no IQ-USP e, o grupo PEQS (Projeto de Ensino de Química em um Contexto Social) no IQ-UnB<sup>43</sup>, produzem esses materiais didáticos. Esses materiais inovadores procuram romper com as deficiências e inadequações dos materiais tradicionais, encontrados no mercado editorial<sup>6</sup>.

As experiências revelaram que o uso de um material didático elaborado com a participação do professor em formação pode abrir uma nova perspectiva para o seu trabalho. Ao se envolver com novas propostas, refletir sobre suas concepções relacionadas ao processo de ensino e de aprendizagem e sobre a mudança da qual participa o professor poderá construir uma nova perspectiva do trabalho docente<sup>6</sup>.

Para o desenvolvimento de tais materiais os autores deverão se atentar às características de um bom texto didático, como o tipo de desenho e figura mais adequados ao texto, tipos de exercício e exemplos importantes ao conteúdo a ser explanado e como incorporar nos materiais didáticos o saber prévio do aluno<sup>6</sup>.

Um roteiro experimental é um material didático que deve apresentar uma estrutura adequada com a finalidade de se obter os objetivos desejados. A estrutura de um roteiro experimental pode ser classificada em quatro categorias: Laboratório formal ou de verificação, laboratório aberto-fechado, baseado num problema e investigatório<sup>44</sup>. Segundo Domin apud Simoni, Andrade & Simoni:

Enquanto o laboratório de verificação exige apenas processos cognitivos de ordem mais baixa, como conhecimento e compreensão, em que o estudante deve apenas seguir passo-a-passo o procedimento experimental e depois preencher uma tabela em branco ou responder a algumas perguntas, previamente formuladas, o laboratório investigatório exige habilidades cognitivas de alta ordem, como análise, síntese e avaliação, uma vez que o estudante deve planejar toda a experimentação, inclusive a escolha do sistema a ser investigado<sup>45</sup>.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***4.1 Material Padrão (Miconazol)***

Padrões de calibração foram preparados a partir do princípio ativo do nitrato de miconazol, o qual se caracteriza por ser um pó cristalino branco. O princípio ativo foi fornecido pela farmácia de manipulação Subtractum. Produzido por VALDEQUIMICA lote número 20141123 em 11/2014.

### ***4.2 Material das amostras (Pomadas)***

As amostras foram feitas a partir de pomadas de nitrato de miconazol obtidas em uma farmácia da região. Foram selecionadas três pomadas, creme vaginal, de laboratórios diferentes: Geolab; Teuto; Pranti-donaduzzi. As três apresentavam em sua composição 20 mg/g de nitrato de miconazol.

### ***4.3 Elaboração do roteiro***

Com base nos tipos de estruturas de roteiros experimentais, foi estabelecido que a forma de organização baseada em princípios cognitivos que teria uma melhor avaliação para o experimento seria pelo método de laboratório formal ou de verificação e investigatório.

Com isto, para elaboração do roteiro foi feito um esboço de um roteiro prévio no qual continha as concentrações e quantidades de substância a ser utilizadas: O princípio ativo- nitrato de miconazol; Os três tipos de pomada- Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi; A solução alcoólica- Metanol PA; Azul de metileno; O passo-a-passo da execução do roteiro experimental.

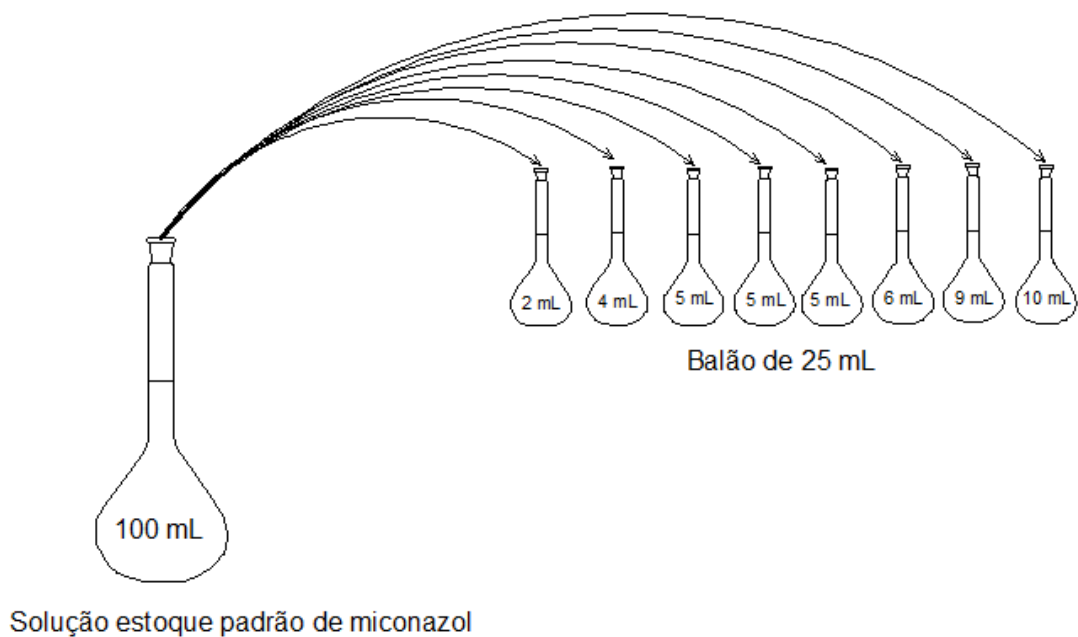
O roteiro definitivo foi feito com base no experimento realizado previamente e tendo como parâmetro os resultados obtidos.

### ***4.4 Preparo dos Padrões e das amostras***

Realizou-se o preparo das amostras para cada um dos métodos de calibração: Padrão externo; Padrão interno; Adição padrão.

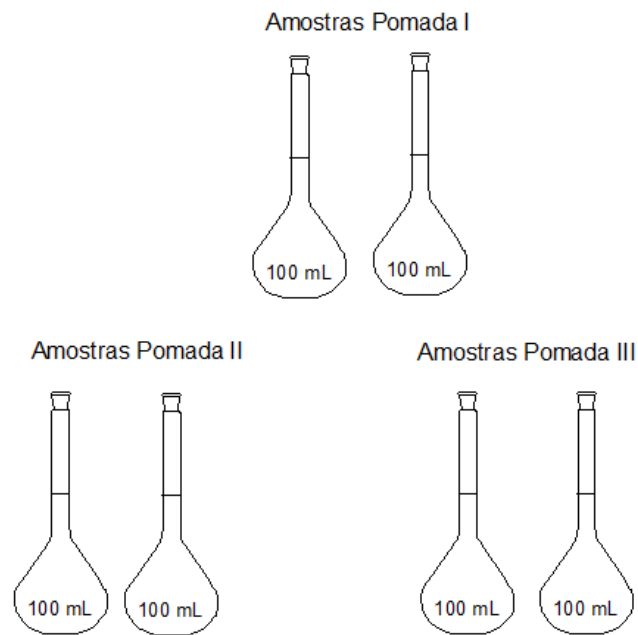
Para a calibração com padrão externo preparou-se uma solução estoque padrão para a calibração de 40 mg/L que continha metanol PA e 0,0040 g de nitrato de miconazol em um balão de 100 mL. Foram retiradas alíquotas de 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 9 mL e 10 mL, sendo que a de 5 mL foi retirada em triplicada, e colocadas cada uma em balões volumétricos diferentes de 25 mL completando o volume até o menisco com metanol PA (Figura 3). Para as amostras de concentração de 10 mg/L em balões de 100 mL, foram preparadas 100 mL de solução, diluindo 0,0500 g de cada pomada em metanol. As amostras autênticas foram feitas em duplicada para cada uma das três pomadas utilizadas: Geolab; Teuto; Pranti-donaduzzi (Figura 4).

Figura 3-Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque colocadas em balões de 25 mL para a calibração.



Fonte: Elaborado pelo autor

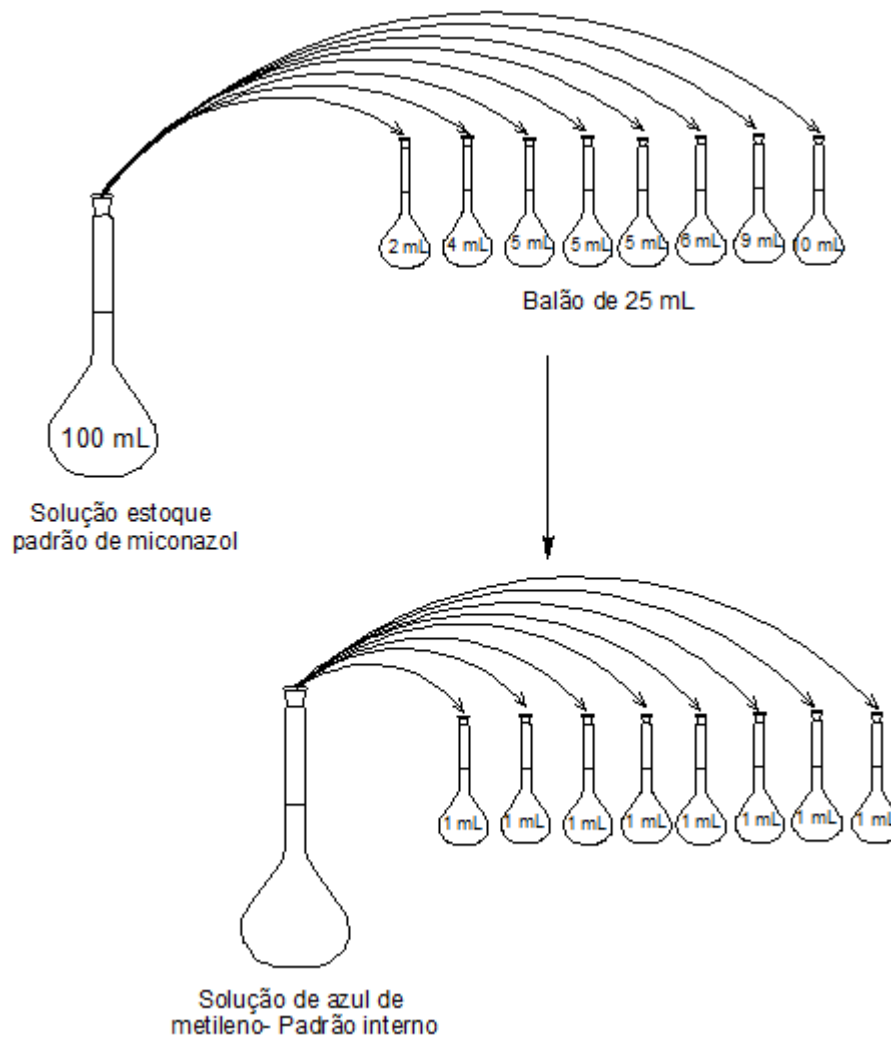
Figura 4- Esquema da solução de amostra preparada em duplicata para cada marca comercial de pomada.



Fonte: Elaborado pelo autor

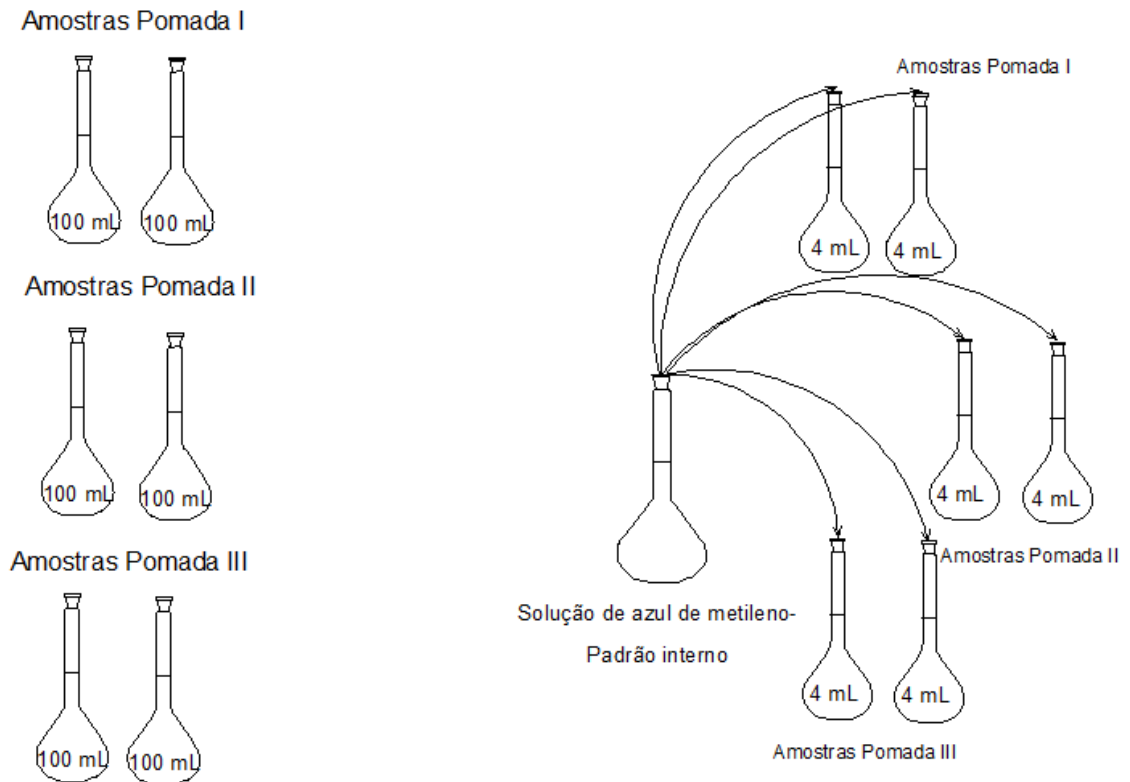
Na calibração empregando o método de padrão interno preparou-se uma solução estoque padrão para a calibração de 40 mg/L que continha metanol PA e 0,0040 g de nitrato de miconazol em um balão de 100 mL. Foi preparada uma solução estoque de azul de metileno 264 mg/L a ser utilizada como padrão interno. Foram retiradas alíquotas de 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 9 mL e 10 mL, sendo que a de 5 mL foi retirada em triplicada, e colocadas cada uma em balões volumétricos diferentes de 25 mL. Adicionou-se 1 mL do padrão interno em cada balão e completou-se o volume até menisco com metanol PA (Figura 5). Foram preparadas amostras autênticas de concentração 10 mg/L em balões de 100 mL, diluindo 0,0500 g de cada pomada em metanol, adicionou-se 4 mL do padrão (azul de metileno) em cada balão completando-o até o menisco (Figura 6). As amostras foram feitas em duplicata para cada uma das três pomadas de marca comerciais diferentes utilizadas: Geolab; Teuto; Pranti-donaduzzi.

Figura 5- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque colocadas em balões de 25 mL e de alíquotas de azul de metileno adicionadas para a calibração.



Fonte: Elaborado pelo autor

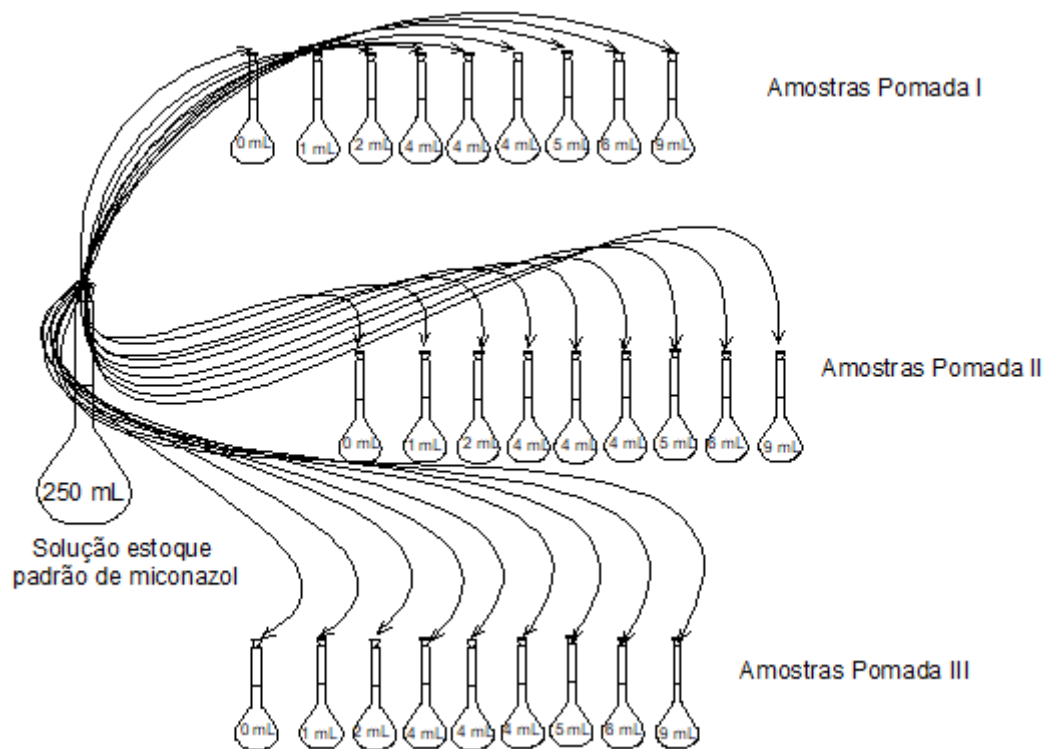
Figura 6.-Esquema da solução de amostra preparada em duplicata para cada marca comercial de pomada adicionando-se a solução de azul de metileno.



Fonte: Elaborado pelo autor

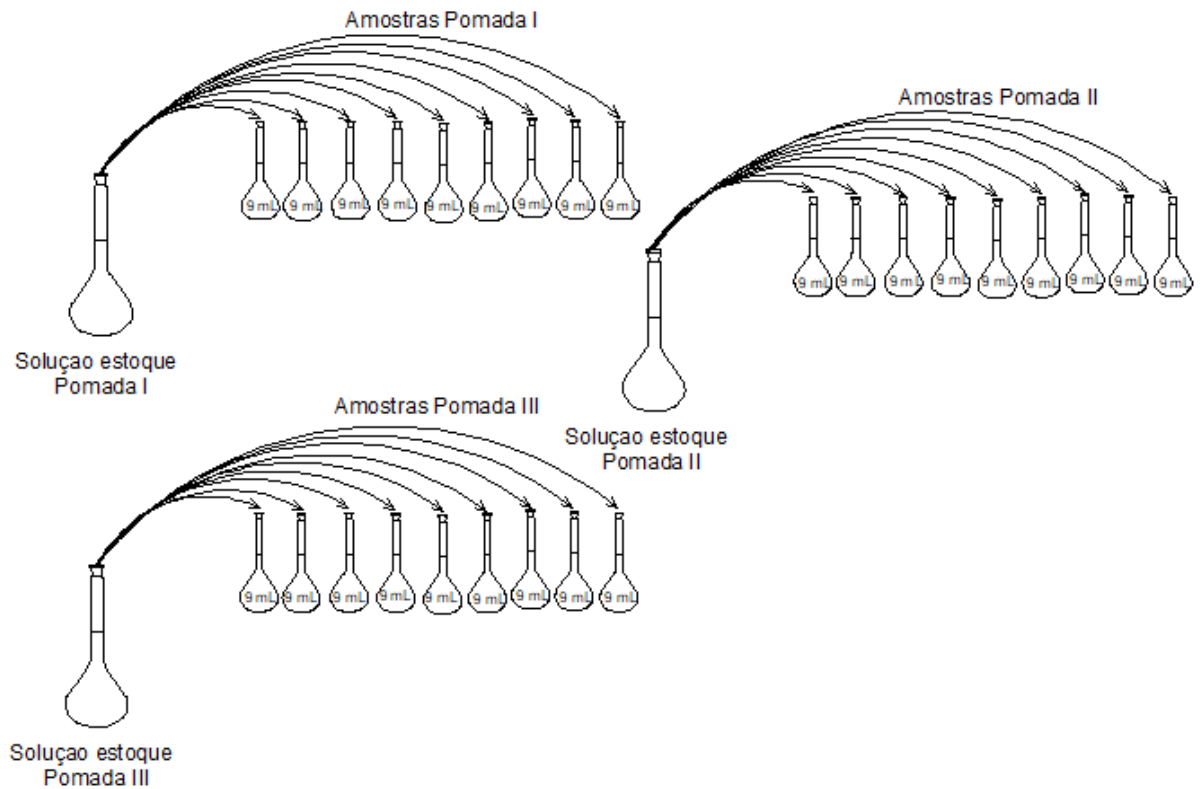
Para uma calibração utilizando o método de adição padrão preparou-se uma solução estoque de padrão para a calibração com concentração de 30 mg/L que continha 0,00750 g de nitrato de miconazol e metanol PA em um balão de 250 mL. Foram preparadas uma solução estoque para cada marca comercial de pomadas com concentração de 10 mg/L em balão de 100 mL, diluindo 0,0500g de pomada em metanol e completando o volume do balão com o mesmo. Em nove balões diferentes de 25 mL foram colocadas alíquotas de 0 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL (em triplicata), 5 mL, 6 mL, e 9 mL da solução padrão (Figura 7). E acrescentou-se 9 mL da solução estoque de pomada em cada um dos balões (Figura 8). Tal procedimento repetiu-se para cada uma das soluções estoque de pomadas de marca comercial diferentes.

Figura 7- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque padrão de miconazol para as respectivas soluções de trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8- Esquema da retirada de alíquotas da solução estoque de cada marca comercial de pomada para as respectivas soluções de trabalho que continham o padrão de miconazol.



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.5 Análise espectrofotométricas no UV-Vis

As análises foram realizadas em triplicatas utilizando um espectrofotômetro de UV-VIS Shimadzu UV-2450, empregando cubetas de quartzo de 1 cm. O conjunto de calibração foi registrado entre 200 nm e 800 nm em intervalos de 0,5 nm.

#### 4.6 Validação do método analítico

A validação do método proposto foi feita conforme a resolução RE nº 899 de 29/05/2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>19</sup>, que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil e conforme o DOQ-CGCRE-008, 2003 do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial)<sup>25</sup>, que traz orientações sobre a validação de

métodos e ensaios químicos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Linearidade, exatidão, precisão e limite de detecção.

#### ***4.7 Análise Estatística***

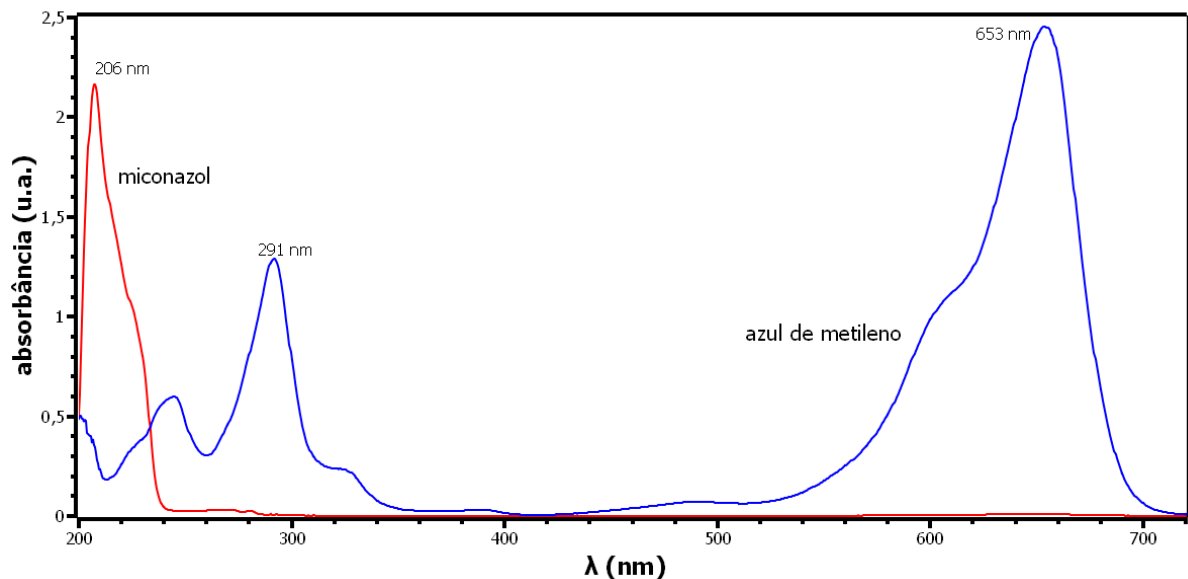
A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), testes t e teste f com nível de confiança de 95%. A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do Software LibreOffice.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Espectros de absorção no UV-Vis

Determinou-se o comprimento de onda no máximo de absorção ( $\lambda_{\max}$ ) para os ensaios de validação e a quantificação do miconazol. Analisando os espectros UV-Vis entre 200 nm e 800 nm, observou-se que as variações espectrais são prioritariamente nas regiões de 206 nm para o princípio ativo (miconazol). Para o padrão interno quando for o caso, as variações são de 291 nm a 653 nm. Observando que a absorbância máxima da solução de azul de metileno ocorreu em um comprimento de onda máximo de 653 nm, como mostrado no espectro de absorção no UV-Vis (Figura 9).

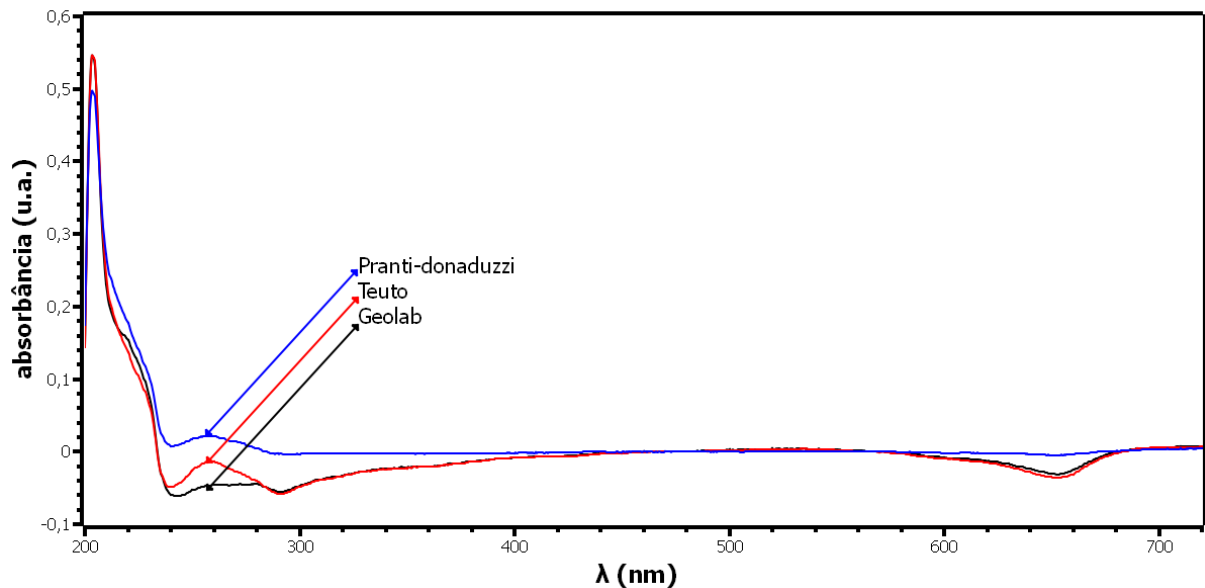
Figura 9- Espectro de absorção no UV- Vis do miconazol e do azul de metileno em solução de metanol.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Analisando os espectros UV-Vis das amostras de pomadas dos três laboratórios (Geolab, Teuto e Pranti-dunaduzzi) das variações entre 200 nm e 700 nm observa-se uma que a absorbância máxima das amostras de pomadas foi aproximadamente de 260 nm para ambos os laboratórios conforme a Figura 10.

Figura 10- Espectro de absorção no UV- Vis das amostras de pomadas.



Fonte: Resultados da pesquisa.

## 5.2 Padrão externo

A análise da curva analítica por meio dos métodos dos mínimos quadrados apresentou a equação  $y = 0,85014x + 0,78870$  e um coeficiente de correlação de 0,86664 conforme a Tabela 2. Indicando a linearidade do método dentro do limite das concentrações estudadas, entretanto conforme descritos no Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) deve ser  $\geq 0,99$ <sup>19</sup>. Toda via quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y obtendo assim um melhor ajuste da função matemática<sup>27</sup>.

Tabela 2- Curva de calibração para o Padrão externo.

Padrão Externo	
ABS (u.a.)	$\gamma$ (mg/L)
0,928	3,44
0,936	3,44
0,937	3,44
1,485	6,88
1,481	6,88
1,490	6,88
1,258	8,60
1,267	8,60
1,271	8,60
1,650	8,60
1,669	8,60
1,656	8,60
1,630	8,60
1,631	8,60
1,630	8,60
1,796	10,32
1,812	10,32
1,805	10,32
2,092	15,48
2,081	15,48
2,093	15,48
2,173	17,20
2,172	17,20
2,165	17,20
ABS = a· $\gamma$ + b	
a	0,085014279886
b	0,78870877193
R <sup>2</sup>	0,866453268554

Fonte: Resultados da pesquisa

Por meio da análise de variância, avaliou-se a significância estatística da curva ajustada e a linearidade do método (Tabela 3). No ajuste da curva obteve-se um valor de  $f_{\text{calculado}}$  de 2,810 menor que o  $f_{\text{tabelado}}$  2,927 comprovando que o ajuste do modelo é satisfatório a um nível de confiança de 95%. O teste da significância da regressão foi analisado por meio da comparação dos valores do  $f_{\text{calculado}}$  142,736 o qual foi muito maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  4,3009 indicando que o método é linear a um nível de confiança de 95%.

Tabela 3-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida.

Fonte	SQ	G.L.	MQ	$MQ_{faj} / MQ_{ep} =$	<b>2,81033205</b>
<b>Modelo</b>	3,04688119	1	3,04688119	$F_{0,95;3;3} =$	<b>2,92774417</b>
<b>Residual</b>	0,46961681	22	0,02134622		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,18053615	4	0,04513404	$MQ_{reg} / MQ_r =$	<b>142,736342</b>
<b>Erro Puro</b>	0,28908067	18	0,01606004	$F_{0,95;1;6} =$	<b>4,3009495</b>
<b>Total</b>	3,516498	23			

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Fonte: Resultados da pesquisa

Aplicando esse método nas amostras de pomada observa-se os valores de absorbância e  $\gamma_{estimado}$  para as amostras de diferentes laboratorios conforme a Tabela 4 e a partir destes valores pode-se calcular a exatidão do método.

Tabela 4- Valores de absorbancia e  $\gamma_{estimado}$  para as amostras de diferentes laboratórios pelo método de padrão externo.

<b>Padrão Externo</b>			
amostra	ABS (u.a.)	$\gamma_{informado}$ (mg/g)	$\gamma_{estimado}$ (mg/g)
Geolab 1	1,677	20	19,9
Geolab 1	1,680	20	19,9
Geolab 1	1,675	20	19,8
Geolab 2	1,651	20	19,1
Geolab 2	1,661	20	19,4
Geolab 2	1,659	20	19,3
Teuto 1	1,725	20	21,6
Teuto 1	1,716	20	21,3
Teuto 1	1,724	20	21,5
Teuto 2	1,724	20	21,7
Teuto 2	1,716	20	21,5
Teuto 2	1,705	20	21,3
Pranti-donaduzzi 1	1,395	20	14,1
Pranti-donaduzzi 1	1,396	20	14,1
Pranti-donaduzzi 1	1,400	20	14,2
Pranti-donaduzzi 2	1,411	20	14,2
Pranti-donaduzzi 2	1,412	20	14,2
Pranti-donaduzzi 2	1,407	20	14,1

Fonte: Resultados da pesquisa

A exatidão de um método é geralmente expressa pela porcentagem de recuperação (R%) da substância de interesse acrescentada de seu intervalo de confiança. Sendo assim o laboratório Geolab pelo método de padrão externo

ocorreu uma recuperação média em relação ao valor informado de 97,83% por essa metodologia. O laboratório Teuto apresentou uma recuperação média de 107,41%. O valor de recuperação média da amostra do laboratório Pranti-donaduzzi foi de 70,75%.

Por essa metodologia e com base nos valores de recuperação obtidos observa-se que as amostras da Geolab e Teuto estão dentro do intervalo esperado de 80-120%.

O intervalo de confiança foi calculado conforme a equação 3, apresentando os seguintes valores para os laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi respectivamente:  $9,89 \pm 0,3364$ ;  $9,89 \pm 0,3381$ ;  $9,89 \pm 0,3493$ .

A precisão de um método pode ser expressa pelo coeficiente de variação (CV%). Sendo assim os valores encontrados por meio da equação 8 foram respectivamente: 7,9% para o laboratório Geolab; 7,9% para o laboratório Teuto e 8,2% para o laboratório Pranti-donaduzzi. Tais valores estão acima do critério de aceitação (<5%) estabelecido no Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003)<sup>19</sup>, demonstrando que o método proposto não apresenta um bom nível de precisão.

A partir da curva analítica pode-se calcular o limite de detecção obtendo-se o valor de  $LD = 0,0103$  para as amostras segundo o método de padrão externo calculado conforme a Equação 11.

### **5.3 Padrão interno**

Para a análise do padrão interno as amostras foram verificadas em variações de 291 nm a 653 nm. A análise da curva de calibração para os valores de  $ABS_{206}/ABS_{291}$  apresentou equação  $y = 0,07044x + 0,80023$  e  $R^2$  de 0,9676. Para os valores de  $ABS_{206}/ABS_{653}$  obteve-se  $R^2$  de 0,9779 e a equação  $y = 0,03807x + 0,40870$  conforme a Tabela 5. Ambos os coeficientes de correlação foram bons e indicando assim a linearidade do método.

Tabela 5- Curva de calibração de Padrão interno de ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> e de ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub>.

Padrão Interno		
ABS <sub>206</sub> /ABS <sub>291</sub>	ABS <sub>206</sub> /ABS <sub>653</sub>	γ (mg/L)
0,94192	0,49160	3,20
0,94745	0,49488	3,20
0,94375	0,49488	3,20
1,26651	0,65755	6,40
1,26056	0,65648	6,40
1,25914	0,65826	6,40
1,44382	0,74722	8,00
1,43770	0,74349	8,00
1,44968	0,75062	8,00
1,40031	0,72816	8,00
1,39297	0,72657	8,00
1,38911	0,72620	8,00
1,39425	0,72827	8,00
1,39643	0,73111	8,00
1,39272	0,73030	8,00
1,47018	0,76842	9,60
1,46219	0,76721	9,60
1,45741	0,76758	9,60
1,75957	0,92736	14,40
1,73565	0,92363	14,40
1,74420	0,92982	14,40
1,94607	1,02433	16,00
1,92939	1,01781	16,00
1,93817	1,02462	16,00
$ABS_{206}/ABS_{291} = a \cdot \gamma + b$		
a	0,070441684964463	
b	0,800234572240774	
R <sup>2</sup>	0,967686999258455	
$ABS_{206}/ABS_{653} = a \cdot \gamma + b$		
a	0,038077337546938	
b	0,408704589964493	
R <sup>2</sup>	0,977948608754829	

Fonte: Resultados da pesquisa

Pela análise de variância pode-se verificar a significância estatística da curva ajustada e a linearidade do método conforme a tabela 6 para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> e tabela 7 para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub>. O ajuste da curva para ambos conjuntos apresentou um valor de  $f_{\text{calculado}}$  maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  demonstrando uma falta de ajuste do modelo. Para o teste de significância da regressão de ambos conjuntos os valores de  $f_{\text{calculado}}$  foram maiores que o  $f_{\text{tabelado}}$  indicando que a um nível de confiança de 95% o método é linear.

Tabela 6-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para padrão interno no conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub>

Fonte	SQ	G.L.	MQ	MQ <sub>faj</sub> / MQ <sub>ep</sub> = 44,1175447931788
<b>Modelo</b>	1,81014890173477	1	1,81014890173477	<b>F<sub>0,95;4;18</sub> = 2,92774417280719</b>
<b>Residual</b>	0,060444485509143	22	0,002747476614052	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,054849793593945	4	0,013712448398486	<b>MQ<sub>reg</sub> / MQ<sub>r</sub> = 658,840512955339</b>
<b>Erro Puro</b>	0,005594691915197	18	0,000310816217511	<b>F<sub>0,95;1;22</sub> = 4,30094950177766</b>
<b>Total</b>	1,87059338724392	23		

Fonte: Resultados da pesquisa

Tabela 7-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para padrão interno no conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub>.

Fonte	SQ	G.L.	MQ	MQ <sub>faj</sub> / MQ <sub>ep</sub> = 62,5277951271717
<b>Modelo</b>	0,528917549925218	1	0,528917549925218	<b>F<sub>0,95;4;18</sub> = 2,92774417280719</b>
<b>Residual</b>	0,011926360675219	22	0,000542107303419	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,01112566861998	4	0,002781417154995	<b>MQ<sub>reg</sub> / MQ<sub>r</sub> = 975,669478329062</b>
<b>Erro Puro</b>	0,000800692055239	18	4,44828919576973E-05	<b>F<sub>0,95;1;22</sub> = 4,30094950177766</b>
<b>Total</b>	0,540843910600436	23		

Fonte: Resultados da pesquisa

Na tabela 8 são apresentados os valores obtidos para o conjunto de amostras com ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> e na Tabela 9 o conjunto de amostras com ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub>. Para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> as amostras do laboratório apresentaram uma recuperação de 127,3%, 131,5% e 99% para os respectivos laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi. No conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> os valores de recuperação foram de 117%, 122% e 92,1% para os laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi respectivamente.

Tabela 8- Conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> com seus respectivos  $\gamma_{\text{estimado}}$ .

Padrão Interno			
amostra	ABS <sub>206</sub> /ABS <sub>291</sub>	$\gamma_{\text{informado}}$ (mg/g)	$\gamma_{\text{estimado}}$ (mg/g)
Geolab 1	1,72015	20	25,8
Geolab 1	1,70381	20	25,3
Geolab 1	1,70055	20	25,2
Geolab 2	1,74294	20	25,7
Geolab 2	1,73388	20	25,5
Geolab 2	1,72629	20	25,3
Teuto 1	1,78042	20	27,3
Teuto 1	1,77819	20	27,3
Teuto 1	1,78624	20	27,5
Teuto 2	1,71033	20	25,1
Teuto 2	1,71442	20	25,2
Teuto 2	1,71956	20	25,4
Pranti-donaduzzi 1	1,46733	20	18,9
Pranti-donaduzzi 1	1,46154	20	18,7
Pranti-donaduzzi 1	1,46029	20	18,7
Pranti-donaduzzi 2	1,55627	20	21,0
Pranti-donaduzzi 2	1,54818	20	20,8
Pranti-donaduzzi 2	1,54257	20	20,7

Fonte: Resultados da pesquisa

Tabela 9- Conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> com seus respectivos  $\gamma_{\text{estimado}}$ .

Padrão Interno			
amostra	ABS <sub>206</sub> /ABS <sub>653</sub>	$\gamma_{\text{informado}}$ (mg/g)	$\gamma_{\text{estimado}}$ (mg/g)
Geolab 1	0,86249	20	23,5
Geolab 1	0,85828	20	23,3
Geolab 1	0,85661	20	23,2
Geolab 2	0,87666	20	23,6
Geolab 2	0,87408	20	23,5
Geolab 2	0,87101	20	23,3
Teuto 1	0,89389	20	25,0
Teuto 1	0,89649	20	25,2
Teuto 1	0,90139	20	25,4
Teuto 2	0,86434	20	23,3
Teuto 2	0,87171	20	23,7
Teuto 2	0,87718	20	23,9
Pranti-donaduzzi 1	0,74413	20	17,6
Pranti-donaduzzi 1	0,74185	20	17,5
Pranti-donaduzzi 1	0,74186	20	17,5
Pranti-donaduzzi 2	0,78279	20	19,3
Pranti-donaduzzi 2	0,78552	20	19,4
Pranti-donaduzzi 2	0,78299	20	19,3

Fonte: Resultados da pesquisa

Para o conjunto de amostras com ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> foi calculado o intervalo de confiança para cada laboratório sendo eles: 9,2±0,1592 laboratório Geolab; 9,2±0,1619 laboratório Teuto; 9,2±0,1461 laboratório Pranti-donaduzzi. No conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> os valores encontrados de intervalo de confiança foram de 9,2±0,0890; 9,2±0,0877; 9,2±0,0968 para os laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi respectivamente.

A precisão do método foi avaliada com base nos resultados de coeficiente de variação confiança (CV%). No conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> os coeficientes de variação foram 4,04% para o laboratório Geolab; 4,1% para o laboratório Teuto e 3,7% laboratório Pranti-donaduzzi. Para o conjunto de amostras ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> os valores encontrados foram 2,25%; 2,22%; 2,45% para os laboratórios Teuto, Geolab e Pranti-donaduzzi respectivamente. Nota-se que os resultados obtidos dos coeficientes de variação (CV%) foram aceitáveis, pois todos os valores encontrados para ambos os conjuntos de amostras foram inferiores a 5% conforme o critério estabelecido pela Resolução RE nº 899, de 29/05/2003<sup>19</sup>.

#### **5.4 Adição padrão**

Para o método de adição padrão as amostras do laboratório Geolab, conforme a tabela 10, apresentaram um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,91954 obtendo uma equação da reta  $y = 0,1294x + 0,5758$ . Indicando que estas amostras se encontram dentro do limite necessário que caracterizam a linearidade do método.

Tabela 10- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratório Geolab.

<b>Adição Padrão</b>	
Geolab	
ABS (u.a.)	$\gamma$ (mg/L)
0,443	0,00
0,462	0,00
0,464	0,00
0,699	1,20
0,709	1,20
0,709	1,20
0,819	2,40
0,828	2,40
0,828	2,40
1,394	4,80
1,413	4,80
1,414	4,80
1,219	4,80
1,222	4,80
1,228	4,80
1,24	4,80
1,245	4,80
1,253	4,80
1,32	6,00
1,32	6,00
1,33	6,00
1,659	7,20
1,664	7,20
1,661	7,20
1,778	10,80
1,785	10,80
1,801	10,80
<b>ABS = a·<math>\gamma</math> + b</b>	
a	0,129840670859539
b	0,575817610062893
R <sup>2</sup>	0,919549897972273
$\gamma_{\text{informado}}$ (mg/g)	20
$\gamma_{\text{estimado}}$ (mg/g)	24,4908414123819

Fonte: Resultados da pesquisa

Verificou-se a significância estatística da curva ajustada e a linearidade do método por meio da Análise de variância (ANOVA) conforme tabela 11. No ajuste da curva obteve-se um valor de  $f_{\text{calculado}}$  de 22,77 sendo este maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  2,71 indicando que o ajuste do modelo não foi satisfatório. A significância da regressão foi analisada por meio da comparação dos valores do  $f_{\text{calculado}}$  285,75 o qual foi muito maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  4,24 indicando que o método é linear a um nível de confiança de 95%.

Tabela 11-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Geolab por adição padrão.

Fonte	SQ	G.L.	MQ	$MQ_{\text{faj}} / MQ_{\text{ep}} = 22,7716422519255$
<b>Modelo</b>	4,28882779147449	1	4,28882779147449	$F_{0,95;5;20} = 2,71088983720969$
<b>Residual</b>	0,375223393710692	25	0,015008935748428	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,349742062799907	5	0,069948412559981	$MQ_{\text{reg}} / MQ_{\text{r}} = 285,75162578891$
<b>Erro Puro</b>	0,061434666666667	20	0,003071733333333	$F_{0,95;1;25} = 4,24169905027715$
<b>Total</b>	4,66405118518519	26		

Fonte: Resultados da pesquisa

A análise da curva de calibração para as amostras do laboratório Teuto apresentou um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,96853 conforme a Tabela 12 e uma equação da reta  $y = 0,13041x + 0,68115$ . Com isto pode-se confirmar a linearidade do método. Destacando-se o fato que o laboratório em questão pelo método de adição padrão apresentou, dentre os três, o melhor valor de  $R^2$ .

Tabela 12- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratório Teuto.

<b>Adição Padrão</b>	
Teuto	
ABS (u.a.)	$\gamma$ (mg/L)
0,58	0,00
0,584	0,00
0,578	0,00
0,841	1,20
0,846	1,20
0,846	1,20
1,014	2,40
1,011	2,40
1,028	2,40
1,323	4,80
1,321	4,80
1,326	4,80
1,317	4,80
1,319	4,80
1,336	4,80
1,332	4,80
1,339	4,80
1,354	4,80
1,432	6,00
1,451	6,00
1,455	6,00
1,759	7,20
1,76	7,20
1,76	7,20
1,958	10,80
1,974	10,80
1,979	10,80
<b>ABS = a·<math>\gamma</math> + b</b>	
a	0,13041142557652
b	0,681154088050314
R <sup>2</sup>	0,968534762898072
$\gamma_{\text{informado}}$ (mg/g)	20
$\gamma_{\text{estimado}}$ (mg/g)	28,8442492171789

Fonte: Resultados da pesquisa

A significância estatística da curva ajustada e a linearidade do método pode ser avaliada por meio da Análise de variância conforme a tabela 13. No ajuste da curva obteve-se um valor de  $f_{\text{calculado}}$  maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  indicando que o ajuste do modelo não foi satisfatório. A significância da regressão foi analisada por meio da comparação dos valores do  $f_{\text{calculado}}$  763,38 o qual foi muito maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  4,24 demonstrando que o método é linear a um nível de confiança de 95%.

Tabela 13-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Teuto por adição padrão.

Fonte	SQ	G.L.	MQ	$MQ_{\text{faj}} / MQ_{\text{ep}} = 295,809717685408$
<b>Modelo</b>	4,29206266501699	1	4,29206266501699	$F_{0,95;5;20} = 2,71088983720969$
<b>Residual</b>	0,140560789308176	25	0,005622431572327	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,138685455974843	5	0,027737091194969	$MQ_{\text{reg}} / MQ_{\text{r}} = 763,381930007297$
<b>Erro Puro</b>	0,0018753333333333	20	9,37666666666672E-05	$F_{0,95;1;25} = 4,24169905027715$
<b>Total</b>	4,46717718518519	26		

Fonte: Resultados da pesquisa

As amostras do laboratório Pranti-donaduzzi obtiveram uma equação da reta igual  $y = 0,13446x + 0,50773$  a qual também demonstrou uma boa linearidade, pois se obteve um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,96762 como mostra a tabela 14.

Tabela 14- Curva de calibração de Adição Padrão para as amostras do laboratório Pranti-donaduzzi.

<b>Adição Padrão</b>	
Pranti-donaduzzi	
ABS (u.a.)	$\gamma$ (mg/L)
0,42	0,00
0,43	0,00
0,435	0,00
0,661	1,20
0,661	1,20
0,66	1,20
0,823	2,40
0,836	2,40
0,836	2,40
1,159	4,80
1,16	4,80
1,171	4,80
1,158	4,80
1,163	4,80
1,167	4,80
1,145	4,80
1,155	4,80
1,152	4,80
1,371	6,00
1,373	6,00
1,387	6,00
1,615	7,20
1,619	7,20
1,631	7,20
1,826	10,80
1,816	10,80
1,821	10,80
<b>ABS = a·<math>\gamma</math> + b</b>	
a	0,134460691823899
b	0,507738993710692
R <sup>2</sup>	0,967627311948733
$\gamma_{\text{informado}}$ (mg/g)	20
$\gamma_{\text{estimado}}$ (mg/g)	20,7296590395603

Fonte: Resultados da pesquisa

Conforme a tabela 15 no ajuste da curva obteve-se um valor de  $f_{\text{calculado}}$  muito maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  indicando que o ajuste do modelo não foi satisfatório. Por meio

do teste da significância da regressão verificou-se que o valor de  $f_{\text{calculado}}$  foi maior que o  $f_{\text{tabelado}}$  demonstrando que o método é linear a um nível de confiança de 95% pela análise de variância.

Tabela 15-Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica obtida para o laboratório Pranti-donaduzzi por adição padrão.

Fonte	SQ	G.L.	MQ	$MQ_{\text{faj}} / MQ_{\text{ep}} = 578,016416164802$
<b>Modelo</b>	4,59946999308176	1	4,59946999308176	$F_{0,95;5;20} = 2,71088983720969$
<b>Residual</b>	0,153878673584906	25	0,006155146943396	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,15282111802935	5	0,03056422360587	$MQ_{\text{reg}} / MQ_{\text{r}} = 747,255920188302$
<b>Erro Puro</b>	0,001057555555556	20	5,28777777778E-05	$F_{0,95;1;25} = 4,24169905027715$
<b>Total</b>	4,75334866666667	26		

Fonte: Resultados da pesquisa

Por meio da porcentagem de recuperação do analítico é possível avaliar a exatidão do método. Sendo assim os valores obtidos foram de 122,45% para o laboratório Geolab; 144,2% para o laboratório Teuto e 103,6% para o laboratório Pranti-donaduzzi. Os valores encontrados para os laboratórios Geolab e Pranti-donaduzzi foram acima do esperado, pois ultrapassam 120%. Já as amostras do laboratório Teuto estão dentro do previsto para este método.

Os intervalos de confiança obtidos para os laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi foram de  $4,66 \pm 0,0459$ ;  $4,66 \pm 0,0448$  e  $4,66 \pm 0,0355$  respectivamente. Tais valores reafirmam os resultados da exatidão do método.

As precisões com base nos valores obtidos de coeficiente de variação foram de 10,8% laboratório Geolab, 10,6% laboratório Teuto e 8,4% laboratório Pranti-donaduzzi. O método de adição padrão obteve valores acima do aceitável (<5%) conforme o critério descrito pela Resolução RE nº 899, de 29/05/2003<sup>19</sup>.

## 5.5 Roteiro

Como proposta de material didático desenvolve-se um roteiro experimental com base nas NBR. Sendo assim o modelo proposto de material didático está em anexo.

## 6. CONCLUSÃO

A metodologia analítica proposta para o desenvolvimento do material didático da validação química para a análise de miconazol utilizando o método espectrofotométrico na região do UV-Vis sendo validado pela Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 mostrou-se linear para ambos os métodos de calibração (Padrão externo, padrão interno e adição padrão), exata e precisa.

O método de padrão externo empregado apresentou uma baixa linearidade tendo como resultado de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,8666 em relação aos métodos de padrão interno que apresentou um  $R^2$  de 0,9676 para ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> e 0,9779 para ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> e o método de adição padrão apresentando um  $R^2$  de 0,9195; 0,9685 e 0,9676 para os respectivos laboratórios Geolab, Teuto e Pranti-donaduzzi. Contudo ao realizar a análise de variância da calibração o método do padrão externo mostrou que o ajuste do modelo é satisfatório a um nível de confiança de 95%, assim como, por meio do teste da significância da regressão indicou que o método é linear a um nível de confiança de 95%.

A exatidão do método foi obtida com base nos valores de recuperação. Para o método de padrão externo os valores foram de 97,83%; 107,41%; 70,75% estando apenas dois laboratórios dentro do intervalo esperado de 80-120%. No método de padrão interno os valores de recuperação para o conjunto de amostra ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> foram 127,3%; 131,5%; 99% e 117%, 122%; 92,1% para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> notando-se que para ambos os conjuntos apenas o laboratório Pranti-donaduzzi apresentou valores dentro do esperado. No método de adição padrão os valores foram acima do intervalo esperado sendo eles 122,4%; 133,2%; 120%.

Na avaliação da precisão do método apenas a calibração por padrão interno obteve valores de coeficiente de variação dentro no estabelecido pela ANVISA (<5%). Para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>291</sub> os coeficientes de variação foram de 4,04%; 4,1% e 3,7% e para o conjunto ABS<sub>206</sub>/ABS<sub>653</sub> foram de 2,25%; 2,72% e 2,45%.

A partir do desenvolvimento da validação analítica e dos resultados do trabalho pode-se desenvolver um material didático, no caso um roteiro experimental, para o ensino técnico em química que abrangesse de maneira simplificada a validação analítica utilizando o método espectrofotométrico na região do UV-Vis.

## REFERÊNCIAS

1. BARROS N., B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada) \*. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 856-865, 2002.
2. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL; **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de METROLOGIA.** Disponível em: <[http://www.inmetro.rs.gov.br/cicmac/material\\_didatico/polig\\_vocab\\_internacional.pdf](http://www.inmetro.rs.gov.br/cicmac/material_didatico/polig_vocab_internacional.pdf)> Acesso em: 19 jun. 2017.
3. VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo.** 2005. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005. Disponível em: <[http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/249297/1/Valderrama,Patricia\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/249297/1/Valderrama,Patricia_M.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2017.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 18 out. 2016.
5. AMARAL, L. C. do. **Livro didático de química: uma reflexão sobre sua escolha e utilização na eja e proeja.** 2009. 19 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Integração da Educação Profissional À Educação Básica na Modalidade de Educação de Jovens e Adultos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://tccproeja2010.pbworks.com/f/LIVRO+DIDÁTICO+DE+QUÍMICA+UMA+REFLEXÃO+SOBRE+SUA+ESCOLHA+E+UTILIZAÇÃO+NA+EJA+E+PROEJA.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2017.
6. SANTOS, F. M. T. dos. Unidades Temáticas - Produção de Material Didático por Professores em Formação Inicial. **Experiências em Ensino de Ciências.** Faculdade de Educação de Ciências UFRGS, v. 2, n. 1, p. 01-11, 2007.
7. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p. 771-780, 2004.
8. SILVA, W.M.; SANTOS, F.R.; BATISTUTI, J.P. Doseamento do ácido fólico. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 275-282, jul./set., 2013.
9. UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Validation of Compendial Methods.** Disponível em: <[http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1225.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html)>. Acesso em: 13 dez. 2016.

10. TAGLIARI, M. P. et al. Desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, Florianópolis, v. 35, n. 6, p.1228-1232, mar., 2012. Disponível em: <[http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No6\\_1228\\_29-NT11720.pdf](http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No6_1228_29-NT11720.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2016
11. MATIOLI, G.; VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 26, n. 2, p.357-364, 4 abr., 2004. Universidade Estadual de Maringá. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actascihealthsci.v26i2.1590>>. Acesso em: 20 out. 2016.
12. SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 297f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
13. PARISOTTO, G. et al. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 499-505, out./dez., 2005.
14. CASTILHO, L.S; PAIXÃO, H.H; PERINI, E. Prescrição de medicamentos de uso sistêmico por cirurgiões-dentistas, clínicos gerais. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n.3, p. 287-294, 1999.
15. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2003. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf)> Acesso em: 21 out. 2016.
16. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)>. Acesso em: 13 dez. 2016.
17. RIBEIRO, F. A. de L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.164-171, 2008. Disponível em: <[http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No1\\_164\\_28-NT07014.pdf](http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No1_164_28-NT07014.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2016.

18. CUSTÓDIO, R.; ANDRADE J. C.; AUGUSTO, F. O Ajuste de Funções Matemáticas aos Dados Experimentais. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p. 219-225, 1997.
19. HARRIS, D.C. **Análise Química quantitativa**. 5ª ed., LTC Editora: Rio de Janeiro, 2001.
20. PIMENTEL, M.F.; BARROS NETO, B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 268-277, 1996.
21. CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.374-380, jun. 2001. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol24No3\\_374\\_13.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol24No3_374_13.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2016.
22. AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C. de; CUSTODIO, R.. **Faixa Linear de Uma Curva de Calibração**. 2000. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=ZmFpeGEtbGluZWYyLWVtYS1jdXJ2YS1kZS1jYWxpYnJhY2Fv>>. Acesso em: 08 nov. 2016.
23. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; **Princípios de Análise Instrumental**, 6a ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.
24. VALENTINI, S.R.; SOMMER W.A.; MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arq. Mudi**, Maringá, v.11, n.2, p. 26-31, 2007.
25. BARROS, C. B. de. **VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. 2002. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64\\_2/barros.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/barros.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2016.
26. PINTO, T. J. A.; FERRARINI, M.; GATTI, R. M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. **Farmácia e Química**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 26-36, 2003.
27. SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª Ed. Thomson, São Paulo-SP, 2006.
28. BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.1004-1011, dez., 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000600027>>. Acesso em: 08 nov. 2016.
29. PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

30. CONCEIÇÃO, Vitor N. et al. Study of scott test using spectroscopic techniques: an alternative method for detecting cocaine hydrochloride and its adulterants in street drugs. **Química Nova**, [s.l.], p.1538-1544, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140240>>. Acesso em 08 nov. 2016.
31. NASCIMENTO, J. A. et al. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria. **Química Nova**, João Pessoa, v. 33, n. 2, p.351-357, jan., 2010.
32. MOREIRA, M. I. de M. C. G. **Azóis: Farmacologia e interações medicamentosas**. 2010. 65 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.
33. CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C.. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, Madrid, v. 23, p.39-49, 2006. Disponível em: <<http://www.reviberoammicol.com/2006-23/039049.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2016.
34. MEDLEY FARMACÊUTICA LTDA. **Miconazol**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4940492014&pIdAnexo=2092836](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4940492014&pIdAnexo=2092836)>. Acesso em: 09 dez. 2016.
35. CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioterapia**. v.19, n.2, p. 130-139, 2006.
36. INFARMED. **Prontuário Terapêutico (2010)**. Disponível em: <<http://docslide.com.br/documents/prontuario-terapeutico-2010.html>>. Acesso em: 17 dez. 2016.
37. MATSUMOTO, L. T. J.; KUWABARA, I. H. A formação profissional do técnico em química: caracterização das origens e necessidades atuais. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.350-359, mar, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000200031>>. Acesso em: 13 out. 2016.
38. SIQUEIRA, M. D.; **Curso de Química: 60 anos de História**, ed. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
39. ZANON, D. A. V.; GUERREIRO, M. A. da S.; OLIVEIRA, R. C. de. Jogo didático Ludo Químico para o ensino de nomenclatura dos compostos orgânicos: projeto, produção, aplicação e avaliação. **Ciênc. cogn.**, Rio de Janeiro , v. 13, n. 1, p. 72-81, mar, 2008. Disponível em <[http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-58212008000100008&lng=pt&nrm=iso](http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-58212008000100008&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 17 jun. 2017.
40. BITTENCOURT, C. Em foco: História, produção e memória do livro didático. **Educação e Pesquisa - Revista da Faculdade de Educação da USP**. São Paulo, Universidade de São Paulo, v. 30, nº3, p. 471-473. set./dez, 2004.

41. SOUZA S.E. O uso de recursos didáticos no ensino escolar. **Arq. Mudi.** v. 11(Supl.2), p.110-114, 2007. Disponível em: <<http://www.dma.ufv.br/downloads/MAT%20103/2015-II/slides/Rec%20Didaticos%20-%20MAT%20103%20-%202015-II.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2017.
42. LOPES, A.C. Discursos curriculares na disciplina escolar de química. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 11, n. 2, p.263-278, 2005.
43. SCHNETZLER, R. P. A Pesquisa em Ensino de Química no Brasil: conquistas e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, Supl.1, p.14-14, 2002.
44. SIMONI, D. de A.; ANDRADE, J. C. de; SIMONI, J. de A. Montagem de uma disciplina experimental: contribuição para a química geral. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n.10, p.1-7, 2011.
45. Domin, D. S.; J. Chem. Educ. 1999, 76, 109.

# ANEXO

<b>Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis</b>	
<b>Categoria baseada em princípios cognitivos:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> laboratório formal ou de verificação	<input type="checkbox"/> laboratório aberto-fechado
<input type="checkbox"/> baseado num problema	<input checked="" type="checkbox"/> investigatório
<b>Classificação para desenvolvimento da prática:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> individual	<input checked="" type="checkbox"/> grupo - colaborativo
<input type="checkbox"/> grupo - cooperativo	
<b>Tipo de experimento:</b>	
<input type="checkbox"/> conceitual	<input type="checkbox"/> metodológico
<input type="checkbox"/> fundamental	<input checked="" type="checkbox"/> quantitativo
<b>Desenvolvimento do pré-experimento:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
<b>Apresentação dos resultados:</b>	
<input type="checkbox"/> nenhuma	<input checked="" type="checkbox"/> oral
	<input checked="" type="checkbox"/> escrita

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	58 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

## 1 – Prefácio

A medida quantitativa de uma propriedade de interesse em um sistema químico é uma das práticas mais frequentes em química analítica. Na grande maioria dos casos, essa propriedade trata da concentração de uma espécie presente no meio<sup>1</sup>. Quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é uma propriedade determinada indiretamente por meio da relação com outra grandeza, como a absorção ou emissão de luz, esta prática é conhecida como calibração<sup>2</sup>. A calibração inclui a seleção do modelo, a estimativa dos parâmetros do modelo e dos erros associados a essas estimativas, e a validação do modelo<sup>3</sup>.

Por meio da Lei de Lambert-Beer pode-se estabelecer uma relação linear entre a concentração do analito em soluções padrão (Soluções com concentrações conhecidas do analito) com a energia absorvida pelas mesmas (absorbância)<sup>4</sup>. Essa relação permite a construção da curva analítica possibilitando a determinação da concentração do analito em uma amostra através de informações de absorbância.

## 2 – Objetivo

- Preparo de soluções;
- Realizar a calibração utilizando o método do padrão externo;
- Realizar a calibração utilizando o método do padrão interno;
- Realizar a calibração utilizando o método de adição padrão;
- Determinar a concentração de nitrato de miconazol em pomadas de diferentes marcas comerciais;
- Validação.

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	59 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

### 3 – Definições

**3.01. Balão volumétrico:** Vidraria para o preparo de soluções com alta precisão e exatidão. Sua marcação de volume é única e fica na parte superior do gargalo.

**3.02. Espectrofotômetro:** Instrumento de análise, amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa, capaz de medir e comparar a quantidade de luz absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra.

**3.03. FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos):** De acordo com a ABNT: A ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) fornece informações sobre vários aspectos de produtos químicos (substâncias ou misturas) quanto à proteção, à segurança, à saúde e ao meio ambiente. A FISPQ fornece, para esses aspectos, conhecimentos básicos sobre os produtos químicos, recomendações sobre medidas de proteção e ações em situação de emergência.

**3.04. Nitrato de miconazol:** É um fármaco utilizado pela medicina como antimicótico. Em doses elevadas pode ser fungicida, mas geralmente é fungistático. Possui fórmula molecular  $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$

**3.05. Pipeta volumétrica:** Instrumento de medição e transferência rigorosa de volumes líquidos.

**3.6. Reagente P.A.:** Expressa o grau de pureza do reagente. Existindo a obrigatoriedade em expressar os teores máximos de impurezas. (P.A. = Para Análise)

### 4 – Método para Execução do Ensaio

O experimento apresenta três variações possíveis para a determinação da concentração de nitrato de miconazol em pomadas de diferentes marcas comerciais. Na

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	60 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

variação A é empregado o método de calibração por padrão externo no qual, um padrão externo é preparado separadamente da amostra e em contraste, um padrão interno é adicionado á própria amostra. Na variação B é empregado o método de calibração por padrão interno no qual uma quantidade de espécie que atua como referência é colocada em todas as amostras. Na variação C é utilizado o método de calibração por adição padrão onde, são feitas as adições de quantidades conhecidas da solução padrão do analito a varias porções da amostra e assim é obtida uma curva de calibração com múltiplas adições.

#### 4.1 – Aparatos

- Metanol PA;
- Princípio ativo do Nitrato de miconazol;
- Pomadas contendo nitrato de miconazol de diferentes marcas comerciais;
- Balões volumétricos de 25 mL;
- Balões volumétricos de 100 mL;
- Balões volumétricos de 250 mL;
- Bastão de vidro;
- Béquer de 25 mL;
- Espátulas;

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	61 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

- Pipetador;
- Pipetas Pasteur
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 9 mL e 10 mL;
- Vidro de relógio;
- Balança volumétrica;
- Espectrofotômetro de UV-VIS Shimadzu UV-2450.

## 4.2 – Procedimento

- **Variação A**

- a) Construção da curva de calibração**

Para a calibração com padrão externo deve-se preparar uma solução estoque padrão para a calibração de 40 mg/L . Pesar 0,0040 g de nitrato de miconazol diluir com metanol PA e colocar em um balão de 100 mL completando o volume até o menisco com metanol PA. Retirar alíquotas de 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 9 mL e 10 mL (Retirar três alíquotas de 5 mL) e colocar cada alíquota em balões volumétricos diferentes de 25 mL completando o volume até o menisco com metanol PA. Obtenha as absorvâncias de cada solução padrão no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 200 nm e 800 nm.

- b) Determinação de nitrato de miconazol em pomadas de diferentes marcas**

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	62 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

### comerciais

Para a análise das amostras de pomadas deve-se preparar soluções de 10 mg/L. Diluir 0,0500 g de pomada em metanol e colocar em balões de 100 mL completando até o menisco com metanol PA. As amostras devem ser feitas em duplicata para cada uma das marcas comerciais. Obtenha as absorvâncias de cada amostra no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 200 nm e 800 nm.

- **Variação B**

#### a) Construção da curva de calibração

Na calibração empregando o método de padrão interno preparar uma solução estoque padrão para a calibração de 40 mg/L . Pesar 0,0040 g de nitrato de miconazol diluir com metanol PA e colocar em um balão de 100 mL completando o volume até o menisco com metanol PA. Preparar uma solução estoque de azul de metileno 264 mg/L a ser utilizada como padrão interno Retirar alíquotas de 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 9 mL e 10 mL (Retirar três alíquotas de 5 mL) e colocar cada alíquota em balões volumétricos diferentes de 25 mL. Adicionar 1 mL do padrão (azul de metileno) em cada balão e completar o volume até menisco com metanol PA. Obtenha as absorvâncias de cada solução padrão no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 200 nm e 800 nm.

#### b) Determinação de nitrato de miconazol em pomadas de diferentes marcas comerciais

Para a análise das amostras de pomadas deve-se preparar soluções de 10 mg/L.

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	63 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

Diluir 0,0500 g de pomada em metanol PA e colocar em balões de 100 mL. Adicionar 4 mL do padrão (azul de metileno) em cada balão completando-o até o menisco com metanol PA. As amostras devem ser feitas em duplicata para cada uma das marcas comerciais. Obtenha as absorvâncias de cada amostra no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 200 nm e 800 nm.

- **Variação C**

**a) Construção da curva de calibração e determinação de nitrato de miconazol em pomadas de diferentes marcas comerciais**

Para uma calibração utilizando o método de adição padrão preparar uma solução estoque de padrão de nitrato de miconazol para a calibração com concentração de 30 mg/L. Pesar 0,00750 g de nitrato de miconazol diluir em metanol PA e colocar em um balão de 250 mL completando o volume até menisco com metanol PA. Preparar solução estoque cada marca comercial. Pesar 0,0500g de pomada e diluir em metanol PA, colocar em um balão volumétrico de 100 mL completando o volume do balão com metanol PA. Retirar da solução padrão de miconazol alíquotas de 0 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL e 9 mL (Retirar três alíquotas de 4 mL) e colocar cada alíquota em balões volumétricos diferentes de 25 mL. Adicionar 9 mL da solução estoque de pomada em cada um dos balões completando o volume até menisco com metanol PA. Repetir o procedimento para cada marca comercial diferente. Obtenha as absorvâncias de cada amostra no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 200 nm e 800 nm.

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	64 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

### 4.3 – Calibração

Verificar com o responsável técnico a validade das calibrações.

### 5 – Resultados

Os discentes deverão apresentar os resultados finais na forma de relatório escrito e apresentação oral. A apresentação deverá conter esquemas do experimento, podendo acrescentar fotos para uma melhor ilustração. Sugere-se o uso do ACD Labs ® para essa finalidade.

Os cálculos pertinentes devem ser demonstrados e que todos os objetivos para esse experimento devem ser explicitados ou no caso de sua impossibilidade deve ser evidenciado as razões que levaram para esse problema. Todos os pontos abordados no pré-experimento devem ser suscitados na apresentação.

### 6 – Precisão

Os valores encontrados devem estar em consonância com os encontrados pela equipe técnica do laboratório em uma significância de 85%.

### 7 – Responsabilidades

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	65 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

O aluno, em caráter obrigatório, deve pesquisar quais EPI e riscos estão envolvidos no decorrer dessa atividade prática. Durante a execução deve usar, em caráter obrigatório, os EPI necessários. Qualquer dúvida o discente deve procurar o docente da disciplina ou o técnico de laboratório responsável no momento da atividade.

## 8 – Referencia Bibliográfica

1. BRAGA, Jez Willian B.; POPPI, Ronei Jesus. **Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo**. Química Nova, [s.l.], v. 27, n. 6, p.1004-1011, dez. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000600027>>. Acesso em 25 de jun. 2017.
2. BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U.; **Recomendações para calibração em química analítica - parte I**. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada) \*. Química Nova, v. 25, p. 856-865, 2002.
3. BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U.; **Recomendações para calibração em química analítica - parte I**. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada) \*. Química Nova, v. 25, p. 856-865, 2002.
4. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; **Princípios de Análise Instrumental**, 6a ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	66 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

### Pré-experimento

1. Com base em informações FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) discorra sobre os perigos envolvidos nesse experimento, incluindo as medidas de segurança que devem ser levadas em conta para uma manipulação adequada e segura dos materiais envolvidos. Não esqueça de disponibilizar as referências utilizadas para essa pesquisa.
  
2. Descreva os procedimentos corretos para descarte ou tratamento dos resíduos ou reutilização dos materiais produzidos nessa aula.
  
3. (Skoog- adaptada) A concentração do íon sulfato em águas naturais pode ser determinada pela medida da turbidez que resulta quando um excesso de  $\text{BaCl}_2$  é adicionado a uma quantidade medida da amostra. Um turbidímetro, instrumento usado para essa análise, foi calibrado com uma série de padrões de soluções padrão de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Os seguintes dados foram obtidos na calibração:

$[\text{SO}_4^{2-}]$ (mg.L <sup>-1</sup> ), <b>C<sub>x</sub></b>	<b>Leitura do Turbidímetro,</b> <b>R</b>
0,00	0,06
5,00	1,48
10,00	2,28

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	67 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

15,00	3,98
20,00	4,61

Considere que existe uma relação linear entre as leituras no instrumento e as concentrações.

- a) Obtenha a concentração de sulfato em uma amostra que gerou uma leitura de 2,84 no turbidímetro. Encontre o desvio padrão absoluto e o coeficiente de variação.

4. (Skoog- adaptada) O potássio pode ser determinado por espectrometria de emissão em chama (fotometria de chama) usando um padrão interno de lítio. Os seguintes dados foram obtidos para soluções padrão de KCl e uma solução desconhecida contendo uma quantidade constante de LiCl como padrão interno. Todas as intensidades foram corrigidas pela subtração da intensidade de emissão do branco.

Concentração de K, ppm	Intensidade de Emissão de K	Intensidade de Emissão de Li
1,0	10,0	10,0
2,0	15,3	7,5
5,0	34,7	6,8
7,5	65,2	8,5
10,0	95,8	10,0
20,0	110,2	5,8
Desconhecida	47,3	9,1

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	68 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			

- 
- a) Calcule a concentração de K na amostra desconhecida para a calibração com padrão externo. Para essa situação, determine as incertezas absolutas e relativas, bem como os parâmetros da curva de calibração.
- b) Calcule a concentração de K na amostra desconhecida para a calibração com padrão interno. Para essa situação determine as incertezas absolutas e relativas, bem como os parâmetros da curva de calibração.

Código do Documento	Data de Criação	Revisão	Página
Validação- Análise de Miconazol	29 de junho de 2017	00 - dezembro de 2017	69 de 69
<b>Assunto</b>			
Determinação espectrofotométrica de Nitrato de Miconazol no UV-Vis			