

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAS



**MIZUEL CARLOS DE ALENCAR**

**AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO MULTI-ENERGÉTICA APLICADA À  
ESPECTROSCOPIA MOLECULAR: ABSORÇÃO UV-VIS E  
FLUORESCÊNCIA**

**Campo Grande**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

**AVALIAÇÃO DA CALIBRAÇÃO MULTI-ENERGÉTICA APLICADA À  
ESPECTROSCOPIA MOLECULAR: ABSORÇÃO UV-VIS E  
FLUORESCÊNCIA**

**MIZAEL CARLOS DE ALENCAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do Título de Mestre Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires  
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Araujo Gonçalves

**Campo Grande, MS**

**2018**

*Dedico esta importante conquista aos meus pais,*

*Luzia Carlos de Alencar e Moacir Alencar Vicente*

*A minha esposa Gisele Souza de Oliveira*

*Aos meus queridos filhos João Victor e Valentina*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por essa imensa oportunidade de aprendizado em minha vida, e pela sua paz que sempre fluiu em meu ser...

Aos meus pais, Luzia e Moacir que me ensinaram o caminho de uma vida feliz, que com honestidade e simplicidade é possível viver o melhor dessa vida.

A minha esposa Gisele que sempre esteve ao meu lado, não me deixando esmorecer.

Ao meu filho João Victor que tanto amo e espero que um dia desfrute o prazer de conquistar uma vida feliz e realizada, através de seu esforço.

A minha querida filha Valentina que faz o amor do mundo todo caber em seu sorriso e me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu orientador, professor Anderson Rodrigues Lima Caires pela orientação, correções e incentivos para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Ao meu co-orientador, professor Daniel Araujo Gonçalves pelos ensinamentos e paciência ao sempre dizer – *“fica calmo, faz com tranquilidade que você vai entender o processo e chegar ao resultado”*.

Ao professor Samuel Leite Rosa pelas críticas construtivas, que ajudaram a lapidar esse projeto.

As minhas colegas de laboratório Cícera e Alessandra que sempre foram muito prestativas em me ajudar em todas as etapas da minha pós-graduação.

A todos os colaboradores do Grupo de Óptica e Fotônica do INFI, Silvano, Juliete e professor Bruno Spolon Marangon pelo apoio, sempre que precisei.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais pelos ensinamentos transmitidos.

As agências de fomento à pesquisa, CNPQ, Capes e FUNDECT pelo apoio financeiro ao programa de Pós-Graduação.

*“Antes eu te conhecia só de ouvir falar,  
mas agora os meus olhos te vêem.” Jó 42.5*

## Resumo

Neste trabalho avaliou-se a aplicação de uma nova metodologia de calibração denominada calibração multi-energética (MEC, do inglês *multi-energetic calibration*), que consiste de uma estratégia que explora um intervalo maior de comprimentos de onda (energia de transição) de vários sinais analíticos de um espectro de fluorescência ou de absorção molecular. Para validação do MEC quantificou-se os corantes *azul de metileno* (AM) e *eosina azul de metileno* (EAM) em diferentes matrizes, como água e metanol, utilizando dois tipos distintos de espectroscopia (fluorescência e absorção UV-Vis). As análises obtidas pelo MEC foram comparadas com um método de calibração tradicional, denominado método de adição de padrão (MAP). A calibração por adição de padrão geralmente emprega uma energia de transição fixa e diferentes concentrações de analito para construir uma curva de calibração. Diferentemente, o MEC usa uma concentração fixa de analito e múltiplas energias de transição para calibração. Os resultados revelaram que o MEC pode ser empregado com sucesso para a quantificação de cromóforos e/ou fluoróforos por meio da espectroscopia de absorção UV-Vis e Fluorescência. Além disso, os resultados mostraram que o MEC foi capaz de detectar e quantificar as moléculas estudadas, a partir da análise de apenas duas soluções, obtendo limites de detecção e quantificação iguais ou melhores que os obtidos pelo MAP. Portanto, o presente estudo demonstrou o grande potencial do MEC para ser utilizado como método de calibração em alternativa aos métodos de calibrações convencionais, possibilitando realizar-se quantificações por meio de análises dos espectros moleculares.

**Palavras-chave:** calibração multi-energética, método de adição de padrão, espectroscopia de fluorescência, absorção UV-Vis.

## Abstract

This work evaluated the application of a new calibration methodology called multi-energetic calibration (MEC), which consists of a strategy that exploits a larger range of wavelengths (transition energy) of several analytical signals of a fluorescence or molecular absorption spectrum. To validate the MEC, methylene blue (AM) and methylene blue eosin (EAM) dyes were quantified in different matrices, such as water and methanol, using two different types of spectroscopy (fluorescence and UV-Vis absorption). The analyzes obtained by the MEC were compared with a traditional calibration method, called the standard addition method (MAP). Standard addition calibration generally employs a fixed transition energy and different concentrations of analyte to construct a calibration curve. In contrast, the MEC uses a fixed concentration of analyte and multiple transition energies for calibration. The results revealed that the MEC can be used successfully for the quantification of chromophores and / or fluorophores by means of UV-Vis absorption spectroscopy and Fluorescence. In addition, the results showed that the MEC was able to detect and quantify the molecules studied, from the analysis of only two solutions, obtaining limits of detection and quantification equal to or better than those obtained by MAP. Therefore, the present study demonstrated the great potential of the MEC to be used as a calibration method as an alternative to conventional calibration methods, making it possible to perform quantifications through molecular spectral analyzes.

**Keywords:** multi-energy calibration, standard addition method, fluorescence spectroscopy, UV-Vis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Curva genérica representando o método de adição de padrão .....	19
Figura 2. Exemplos de moléculas de alcenos e alcinos .....	23
Figura 3. Diagrama de níveis energéticos mostrando algumas mudanças que ocorrem durante a absorção da radiação infravermelha (IR), visível (VIS) e ultravioleta (UV) por espécies moleculares. ....	25
Figura 4. Esquema básico das partes de um espectrômetro de absorção UV-Vis.....	26
Figura 5. Diagrama de Jablonski simplificado .....	29
Figura 6. Esquema básico de um espectrofluorímetro.....	31
Figura 7. Estrutura química do azul de metileno .....	32
Fígura 8. Estrutura química da eosina azul de metileno .....	32
Figura 9 - Balões de 10 mL representando a distribuição volumétrica da amostra e do padrão diluídos em água .....	35
Figura 10. Balões de 10 mL representando a distribuição volumétrica da amostra e padrão	36
Figura 11. Espectro de fluorescência do azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol, $\lambda_{excitação} = 630$ nm.....	39
Figura 12. Espectro de absorbância do azul de metileno diluído em água e metanol .....	39
Figura 13. Espectro de fluorescência da eozina azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol, $\lambda_{excitação} = 300$ nm. ....	40
Figura 14. Espectro de absorbância da eosina azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol.....	40
Figura 15. Espectros de fluorescência do AM em água, $\lambda_{excitação} = 630$ nm, utilizado na análise do MAP.....	41
Figura 16. Intensidade de fluorescência em função da concentração de AM em água para cada adição.....	42
Figura 17. Espectros de absorbância do AM em água, utilizado na análise do MAP. ....	43
Figura 18. Absorbância em função da concentração de AM em água em cada adição.....	44
Figura 19. Espectros de fluorescência do AM em água. $\lambda_{excitação} = 630$ nm, utilizado na análise do MEC.....	45
Figura 20. Intensidade de fluorescência da solução (amostra + água) vs. solução (amostra + padrão) .....	45
Figura 21. Espectros de absorbância do AM em água, utilizado na análise do MEC .....	46

Figura 22. Absorbância da solução (amostra + água) vs. solução (amostra + padrão) .....	47
Figura 23. Espectros de fluorescência do AM em metanol, $\lambda_{excitação} = 630$ nm, para análise pelo MAP.....	48
Figura 24. Intensidade de fluorescência do AM em água em função da concentração em cada adição .....	48
Figura 25. Espectros de absorbância do AM em metanol, para análise do MAP.....	49
Figura 26. Sinal de absorbância gerado pela análise do MEC para o corante AM em metanol .....	50
Figura 27. Espectros de fluorescência do AM em metanol, $\lambda_{excitação} = 630$ nm, para análise do MAP.....	51
Figura 28. Intensidade de fluorescência do AM em metanol para a solução (amostra + metanol ) vs. solução (amostra + padrão) .....	51
Figura 29 - Espectros de absorbância do AM em metanol, utilizado na análise do MEC. ....	52
Figura 30. Sinal de absorbância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para o AM em metanol .....	53
Figura 31. Espectros de fluorescência da EAM em água, $\lambda_{excitação} = 300$ nm, utilizado para análise do MAP.....	56
Figura 32. Intensidade de fluorescência em função da concentração de EAM em água para cada adição. ....	57
Figura 33. Espectros de absorbância da EAM em água, utilizado na análise do MAP.....	58
Figura 34. Sinal de absorbância da EAM em água, utilizado na análise do MAP .....	58
Figura 35. Espectros de fluorescência da EAM em água, $\lambda_{excitação} = 300$ nm, utilizado na análise do MEC.....	59
Figura 36. Intensidade de fluorescência da solução (amostra + água ) vs. solução (amostra + padrão) .....	60
Figura 37. Espectros de absorbância da EAM em água, utilizado na análise do MEC.....	61
Figura 38. Sinal de absorbância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para a EAM em água .....	61
Figura 39. Espectros de fluorescência da EAM em metanol, $\lambda_{excitação} = 300$ nm, utilizado na análise do MAP.....	62
Figura 40. Intensidade de fluorescência da EAM em metanol em função da concentração em cada adição.....	63
Figura 41. Espectros de absorbância da EAM em metanol, utilizado na análise do MAP. ...	64

Figura 42. Sinal de absorbância da EAM em metanol, utilizado na análise do MEC.....	64
Figura 43. Espectro de fluorescência da EAM em metanol, $\lambda_{\text{excitação}} = 300 \text{ nm}$ , utilizado na análise do MEC.....	65
Figura 44. Intensidade de fluorescência da EAM em metanol para a solução (amostra + metanol ) vs. solução (amostra + padrão).....	66
Figura 45. Espectro de absorbância da EAM em metanol, utilizado na análise do MEC .....	67
Figura 46. Sinal de absorbância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para o EAM em metanol.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos resultados do corante AM adquiridos por espectroscopia de fluorescência e absorção UV-Vis utilizando o MAP e o MEC .....54

Tabela 2. Resumo dos resultados do corante EAM adquiridos por espectroscopia de fluorescência e absorção UV-Vis utilizando o MAP e o MEC .....68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AES	Atomic emission spectroscopy
AM	Azul de metileno
CBC	Carcinoma basocelular
$C_a$	Concentração da amostra
$C_{amostra}$	Concentração da amostra
$C_{padrão}$	Concentração do padrão
CE	Calibração externa
EAM	Eosina azul de metileno
HR-CS FAAS	High-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry
ICP	Inductively-coupled plasma
IR	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAP	Método de adição de padrão
MEC	Multi-Energy Calibration
MIP	Microwave-induced plasma
OES	Optical emission spectrometry
PI	Padronização externa
$S_a$	Sinal analítico
$S_{amostra}$	Sinal da amostra
$S_{padrão}$	Sinal do padrão
RECP%	Recuperação
RSD%	Desvio padrão relativo
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 MÉTODO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (MAP) .....	18
3.2 CALIBRAÇÃO MULTI-ENERGÉTICA (MEC – <i>MULTI-ENERGY CALIBRATION</i> )...19	
4. ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO .....	21
4.1 INFRAVERMELHO .....	21
4.2 LUZ ULTRAVIOLETA (UV) E VISÍVEL (VIS).....	22
4.3 LUZ ULTRAVIOLETA .....	22
5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS.....	23
5.1 TRANSMITÂNCIA.....	26
5.2 ABSORBÂNCIA (LEI DE LAMBERT-BEER) .....	27
6 FLUORESCÊNCIA MOLECULAR .....	28
7. CORANTES.....	31
7.1 AZUL DE METILENO .....	31
7.2 EOSINA AZUL DE METILENO.....	32
8 OBJETIVOS .....	32
8.1 OBJETIVO GERAL .....	32
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
9 MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
10 METODOLOGIA .....	34
10.1 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO E AMOSTRA PARA O MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO (MAP).....	34
10.2 PREPARO DA AMOSTRA PARA O MEC.....	35
11 ESTATÍSTICA .....	36
12 RESULTADOS.....	38
12.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AM EM ÁGUA UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC .....	41
12.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AM EM METANOL UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC .....	47
12.3 RESUMO DOS RESULTADOS PARA O AM.....	55
12.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA EAM EM ÁGUA UTILIZANDO A	

TÉCNICA DO MAP E MEC. ....	56
12.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA EAM EM METANOL UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC .....	63
13 CONCLUSÃO .....	71
14 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de técnicas ópticas como de absorção no ultravioleta-visível, e espectroscopia de fluorescência, tem sido frequentemente empregada em análises farmacêuticas. Devido ao progresso contínuo em técnicas e instrumentos, a indústria farmacêutica busca o emprego de metodologias que ofereçam maior sensibilidade, seletividade, robustez, precisão, exatidão e rapidez.

Muitas substâncias farmacêuticas são quantificadas na região do espectro UV-Vis com grande precisão e sensibilidade, e são altamente adequados para ensaios quantitativos. Tal facilidade fez com que a Farmacopeia American, em seu capítulo Espectroscopia Ultravioleta Visível - USP 857 descreve-se procedimentos para preparo de amostras, validação, robustez, exatidão e precisão dos dados obtidos por UV-Vis<sup>1</sup>.

Para a espectrofotometria de fluorescência as quantificações, ainda são mais sensíveis que a espectrofotometria de absorção, as recomendações de uso estão descritas pela Farmacopeia American, em seu capítulo Espectroscopia de Fluorescência - USP 853<sup>2</sup>

Além deste capítulo, procedimentos para calibração instrumental e validação de dados obtidos por fluorescência são descritos pelo National Institute of Standards and Technology – NIST, em Standard Guide to Fluorescence - Instrument Calibration and Validation - NISTIR 7458, onde lista materiais e métodos disponíveis para calibração ou correção de instrumentos de fluorescência (i.e., correção espectral de emissão, precisão de comprimento de onda, etc.) com precisão e exatidão dadas em um bom nível de confiança<sup>3</sup>.

Em análises laboratoriais quantitativas, a escolha do método de calibração é uma etapa crucial, principalmente quando estão envolvidas amostras ou matrizes complexas<sup>1</sup>. Preferencialmente, as soluções de calibração devem ser preparadas em meio semelhante ao da amostra, de forma a se evitarem efeitos de matriz. Porém, este ajuste de matriz nem sempre é perfeitamente atingido, e em alguns casos, pode ser uma tarefa difícil.

Em análises espectroscópicas, as calibrações mais difundidas são a calibração externa (CE), a padronização interna (PI) e o método de adição de padrão (MAP)<sup>4,5</sup>. Devido à facilidade operacional, a CE é o método mais empregado. Na calibração externa, supõe-se que os efeitos de matriz são desprezíveis, e as soluções de calibração são preparadas com o branco da amostra. Esta estratégia é utilizada com relativo sucesso para muitas aplicações, mas é pouco eficaz em determinações envolvendo matrizes complexas<sup>4-6</sup>.

Quando a causa principal de baixa precisão está relacionada com efeitos de transporte de solução, o método da padronização interna (PI)<sup>6,7</sup> apresenta-se como alternativa à CE. Em PI, uma espécie química que apresente o mesmo comportamento do analito deve ser adicionada (com concentração constante) aos brancos, padrões e amostras, e ambos padrão interno e analito são medidos simultaneamente (ou sequencialmente). A curva de calibração é construída plotando-se a razão sinal do analito/sinal do padrão interno *versus* concentração do analito. A principal limitação da PI é a sua incapacidade para corrigir interferências espectrais e em muitos casos efeitos de matriz. Outra dificuldade está relacionada à escolha do padrão interno ideal, uma tarefa desafiadora para alguns analitos.

Em situações envolvendo efeitos severos de matriz, o método da adição de padrão (MAP) é a estratégia mais recomendada visando assegurar-se precisões/exatidões adequadas<sup>5</sup>. Apesar de apresentar desempenho superior ao da CE, o MAP é demorado e trabalhoso porque se constrói uma curva de calibração para cada amostra individualmente. Além disso, é ineficiente para corrigir flutuações de sinal analítico causadas por parâmetros instrumentais ou operacionais dos equipamentos.

Dependendo da técnica instrumental utilizada, esses métodos de calibração citados podem apresentar vantagem e limitações para corrigir interferências espectrais e matriciais. Isso torna mais difícil ainda a escolha do método de calibração mais adequado.

Nesse contexto, combinar dois métodos de calibração distintos para unir seus respectivos benefícios ou potencializá-los, criando novos métodos de calibração em técnicas espectroscópicas, parece promissor e relevante. Integrar dois métodos de calibração que resulte em um novo método requer a compreensão dos limites e/ou potencialidades tanto da técnica instrumental como dos métodos envolvidos. Além do mais, é necessário arquitetar um novo conceito matemático e experimental, como base nos fundamentos desses dois métodos<sup>4-9</sup>. O objetivo de escolher dois métodos para uma calibração simultânea é melhorar o desempenho analítico de ambos, por meio das vantagens apresentadas por cada um dos métodos utilizados sem alterar os seus princípios fundamentais. Deste modo, a concentração do analito na amostra é obtida aplicando as expressões matemáticas referentes a um dos métodos. Porém, a curva de calibração é concebida a partir de ambos os métodos envolvidos, por meio de adaptações no procedimento experimental<sup>4-9</sup>.

Estratégias de calibração como, calibração multivariada, análise por gradiente de concentração ou injeção em fluxo são alternativas para correções de interferências matriciais e erros relacionados a introdução de amostras<sup>12-15</sup>. Contudo, ambos os métodos são geralmente aplicados a instrumentações com quantificações simultâneas ou sequencialmente rápidas, e que

oferecem fluxo contínuo para introdução de amostras. Por esta razão, não seriam possíveis de serem executados, por exemplo, em atomizadores eletrotérmicos e em alguns casos possuem complexos sistemas de introdução de amostras.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando os métodos de calibração apresentados para execução do procedimento de calibração analítica, a resposta instrumental está diretamente relacionada com a variação da concentração do analito na solução padrão de referência em um comprimento de onda fixo. Uma estratégia pouco observada, e que pode ser muito bem aplicada para fins de calibração, seria a obtenção da resposta instrumental a partir de múltiplos comprimentos de onda em uma concentração fixa de analito. Esta nova estratégia para calibração analítica é denominada Calibração Multi-Energética (MEC – do Inglês, Multi-Energy Calibration)<sup>12,13</sup>. Esta proposta de calibração compatibiliza a matriz da amostra com uma única solução padrão de referência para melhorar significativamente a exatidão dos dados analíticos. O primeiro trabalho com este novo método de calibração foi apresentado no *Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, 2016, Tucson, AZ, USA e o primeiro artigo científico foi publicado junho de 2017 (*Analytica Chimica Acta*, 2017, 982 31- 36)<sup>13</sup> aplicado a técnicas de espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma (ICP OES e MIP-AES) e absorção atômica de alta resolução (HR-CS FAAS). Este projeto de mestrado será a primeira aplicação do MEC à espectroscopia molecular em especial a espectroscopia de fluorescência e absorção UV-Vis.

## 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A concentração de uma amostra sempre é obtida de forma indireta, por não ser uma grandeza física observável. Uma das formas indiretas de se realizar medidas de concentração é, por exemplo, a partir de grandezas mensuráveis como a capacidade que a amostra tem em absorver e/ou emitir luz<sup>14</sup>.

Todavia, antes da realização de quantificação de uma determinada grandeza, uma parte muito importante de todos os procedimentos analíticos é o processo de calibração e padronização. De acordo com a última recomendação do Comité Conjunto de Guias em Metrologia A calibração é definida como "operação que, em condições especificadas, em um primeiro passo, estabelece uma relação entre os valores de quantidade com incertezas de

medição fornecidas por padrões de medição e indicações correspondentes com medição incertezas associadas e, em um segundo passo, usa essa informação para estabelecer uma relação para obter um resultado de medição a partir de uma indicação<sup>15</sup>.”

### 3.1 MÉTODO POR ADIÇÃO DE PADRÃO (MAP)

No (MAP) consiste na adição de uma determinada quantidade de analito padrão em uma amostra, onde a concentração desse analito já existente na amostra seja desconhecida. Deve-se medir a resposta da amostra antes e após as adições múltiplas, nas mesmas condições espectrofotométricas, e assegurar que a resposta do instrumento utilizado nas medidas tenha uma resposta linear em relação à concentração do analito contido na amostra. Desse modo, pode-se minimizar a ação de interferentes contidos na amostra. O efeito dos interferentes é praticamente o mesmo nas soluções de amostra e padrão<sup>18</sup>.

Na prática, as soluções padrão da curva analítica são preparadas na matriz da amostra contendo o analito. O sinal analítico obtido ( $S_a$ ) corresponde à soma do sinal da amostra mais ao do padrão adicionado ( $S_a = S_{amostra} + S_{padrão}$ ) e será proporcional à concentração [ $C_a$ ] do analito ( $C_a = C_{amostra} + C_{padrão}$ ).

Os dados de sinal e concentração são relacionados através de uma equação de primeiro grau e representados através de um gráfico.

$$y = ax + b \quad \text{Eq. 1}$$

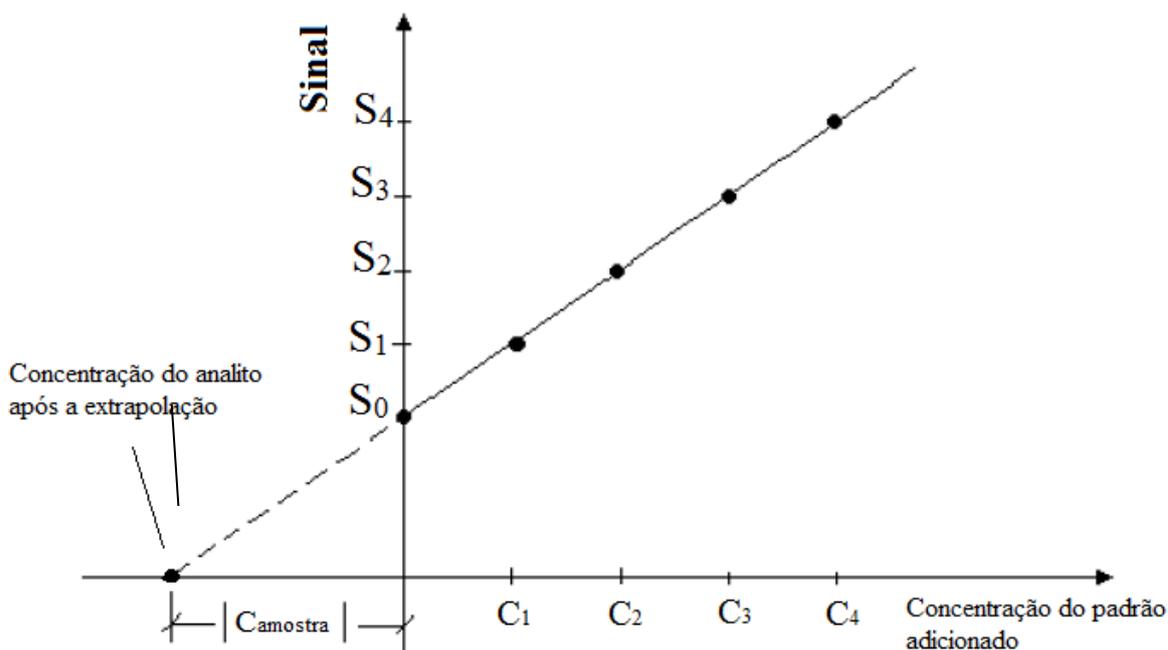
No eixo da abcissa e ordenada representam respectivamente os valores de sinal e o equivalente a concentração do analito na amostra ou massa adicionada<sup>19</sup>.

A concentração do analito, na amostra desconhecida [ $C_{amostra}$ ] pode ser obtida, por extrapolação da curva de regressão para o eixo das concentrações ou utilizando os parâmetros da equação reta ajustada aos pontos, onde:

$$C_{amostra} = |b/a| \quad \text{Eq. 2}$$

Quando  $y = 0$  na equação Eq. 1, como se pode verificar na figura mostrada a baixo:

Figura 1- Curva genérica representando o método de adição de padrão.



Fonte: Caio (2016)

Como em todas as soluções de calibração, as concentrações crescentes de analito são acompanhadas da mesma quantidade de interferentes, o método dá a chance de eliminar (compensar) efeitos de interferência, mas apenas de natureza multiplicativa. Por outro lado, o erro sistemático causado pelo efeito não-linear da matriz pode ser bastante significativo por causa do processo de extrapolação. Quanto maior o número de pontos no gráfico maior a precisão, porém isso representa uma desvantagem significativa do método que é o tempo extra requerido para se fazer as adições e medidas<sup>18-19</sup>.

### 3.2 CALIBRAÇÃO MULTI-ENERGÉTICA (MEC – *MULTI-ENERGY CALIBRATION*)

Neste trabalho detalhamos e validamos um novo método de calibração denominado calibração multi-energética (MEC – *multi-energy calibration*, em inglês)<sup>13</sup>. Nessa metodologia de calibração, apenas duas soluções de calibração são necessárias por amostra. A solução 1 é composta por 50%  $vv^{-1}$  da amostra e 50%  $vv^{-1}$  de uma solução padrão contendo os analitos. A solução 2 possui 50%  $vv^{-1}$  da amostra e 50%  $vv^{-1}$  branco (Solvente). A proporção 1:1 é adotada por simplicidade. No entanto, enquanto a quantidade de amostra for constante em ambas as soluções, outras proporções de mistura, também podem ser usadas. O tratamento matemático

usado para determinar a concentração de analito na amostra é realizado diretamente a partir das seguintes relações:

$$I(\lambda_i)^{Amostra+Padr\tilde{a}o} = m(C^{Amostra} + C^{Padr\tilde{a}o}) \quad \text{Eq. 3}$$

$$I(\lambda_i)^{Amostra} = m(C^{Amostra}) \quad \text{Eq. 4}$$

Onde  $I(\lambda_i)^{Amostra+Padr\tilde{a}o}$  e  $I(\lambda_i)^{Amostra}$  são as respostas dos instrumentos em um certo comprimento de onda (i) para as soluções 1 e 2, respectivamente;  $m$  é uma constante de proporcionalidade; e  $C^{Amostra}$  e  $C^{Padr\tilde{a}o}$  são as concentrações de analito na amostra e na solução padrão adicionada à solução 1. Se considerarmos as mesmas condições instrumentais, e a mesma matriz, uma vez que ambas as soluções possuem 50%vv<sup>-1</sup>, as equações. (3) e (4) podem ser combinadas (Eq. (5)) e rearranjadas (Eq. (6)):

$$\frac{I(\lambda_i)^{Amostra}}{C^{Amostra}} = \frac{I(\lambda_i)^{Amostra+Padr\tilde{a}o}}{C^{Amostra} + C^{Padr\tilde{a}o}} \quad \text{Eq. 5}$$

$$I(\lambda_i)^{Amostra} = I(\lambda_i)^{Amostra+Padr\tilde{a}o} \left[ \frac{C^{Amostra}}{C^{Amostra} + C^{Padr\tilde{a}o}} \right] \quad \text{Eq. 6}$$

Ao plotar  $I(\lambda_i)^{Amostra}$  (da solução 2) no eixo y versus  $I(\lambda_i)^{Amostra+Padr\tilde{a}o}$  (da Solução 1) no eixo dos x, com respostas dos instrumentos referentes aos vários comprimentos de onda diferentes ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \dots, \lambda_n$ ), a inclinação gerada a partir dessa regressão linear será:

$$n = \left[ \frac{C^{Amostra}}{C^{Amostra} + C^{Padr\tilde{a}o}} \right] \quad \text{Eq. 7}$$

Como  $C^{Padr\tilde{a}o}$  é conhecido, a concentração de analito na amostra pode então ser facilmente determinada ao reorganizar a Eq. (7):

$$C^{Amostra} = \frac{nC^{Padr\tilde{a}o}}{(1-n)} \quad \text{Eq. 8}$$

Para demonstrar sua viabilidade e potencial para ampla aplicação, o MEC foi utilizado com duas técnicas espectroscópicas moleculares diferentes (**fluorescência e absorção ultravioleta-Visível**). Dois analitos (**azul de metileno e eosina azul de metileno**) em diferentes solventes (**água destilada e Metanol**) para avaliar a robustez do método. Os resultados das concentrações obtidas pelo MEC foram comparados com os valores obtidos utilizando MAP.

#### 4. ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

O espectro de radiações eletromagnéticas estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio, com longos comprimentos de onda ( $10^3 - 10^0$  m), até radiações de altíssima energia (raios-X e raios- $\gamma$ ) com comprimentos de onda muito curtos, entre  $10^{-10}$  e  $10^{-15}$  m. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre microondas e o ultravioleta. Cada uma dessas regiões tem suas formas próprias de serem produzidas e detectadas e não existe uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes, sendo o espectro contínuo do ponto de vista macroscópico<sup>20,21</sup>.

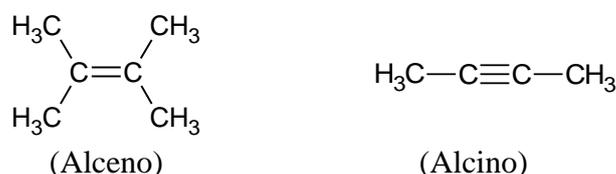
##### 4.1 INFRAVERMELHO

Infravermelho estende-se do limite superior da faixa de microondas até o começo da região visível. A parte de comprimentos de onda mais longos (0,1 – 1 mm) é aplicável à excitação de espectros rotacionais, enquanto a extremidade de comprimentos de ondas menores (o infravermelho próximo,  $10^{-3} - 10^{-1}$  mm) é a região onde espectros vibracionais típicos das moléculas são observados: os chamados espectros rotacionais-vibracionais<sup>22-24</sup>.

As moléculas, quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas, atingindo um estado de maior energia. A absorção de radiação no infravermelho corresponde a alterações de energia da ordem de 8 a 40 kJ/mol. A radiação nessa faixa de energia corresponde à faixa que engloba frequências vibracionais de estiramento e dobramento geralmente das moléculas com ligações covalentes. No processo de absorção são absorvidas as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula em questão, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. Quando radiação eletromagnética na região do infravermelho interage com uma molécula, para que o movimento vibracional possa ser interpretado

experimentalmente, um fato que deve necessariamente acontecer é que o momento de dipolo intrínseco da molécula varie com o movimento vibracional. Para vibrações moleculares que não produzam mudança no momento de dipolo a transição vibracional não será observada, ou seja, a intensidade desta absorção será nula. Uma ligação simétrica que tenha grupos idênticos ou praticamente idênticos em cada ponta não absorverá no infravermelho, as ligações mais propensas a serem afetadas por essa restrição são aquelas de alcenos ( $C = C$ ) e alcinos ( $C \equiv C$ )<sup>25-26</sup>.

Figura 2. Exemplos de moléculas de alcenos e alcinos.



Fonte: Autor

## 4.2 LUZ ULTRAVIOLETA (UV) E VISÍVEL (VIS)

Luz Visível região do espectro eletromagnético onde o olho humano tem condições de percebê-lo o intervalo de frequências vão de  $4,3 \cdot 10^{14}$  Hz a  $7 \cdot 10^{14}$  Hz (com comprimento de onda entre 400 e 800 nm), preenchendo uma faixa bem estreita do espectro eletromagnético, denominado luz visível. A luz visível é produzida ou pelos corpos muito quentes (fonte: vibração atômica), ou através das transições eletrônicas nos átomos que compõem o corpo. No último caso, a energia que o átomo adquiriu de alguma maneira não se gasta na agitação da sua vibração, mas para promover os seus elétrons para o estado com a energia mais alta. Quando os elétrons retornam para o estado da energia inicial, o excesso da energia é emitido na forma das ondas eletromagnéticas de luz visível ou ultravioleta<sup>18, 25,26</sup>.

## 4.3 LUZ ULTRAVIOLETA

Luz ultravioleta possui comprimentos de onda na faixa de 400 nm até 0,6 nm. Essa luz é produzida pelas transições eletrônicas que ocorrem nos átomos e moléculas excitados, da mesma maneira como luz visível (somente as transições agora envolvem energias maiores). A energia da radiação ultravioleta é grande, comparável com a energia suficiente para retirar elétrons dos átomos (efeito fotoelétrico). Portanto, essa radiação pode causar danos aos tecidos

vivos, como por exemplo, à nossa pele. O Sol é uma fonte poderosa da radiação ultravioleta (que vem junto com a radiação visível e infravermelha)<sup>18,25,26</sup>.

## 5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS

A espectroscopia de absorção UV-Vis utiliza radiação eletromagnética cujos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) se encontram na faixa de 200 a 780 nm. Quando estimulada com esse tipo radiação, a molécula do composto pode sofrer transições eletrônicas por ocasião da absorção de energia quantizada.

A absorção de energia UV-Vis produz modificação na estrutura eletrônica da molécula em consequência de transições envolvendo, geralmente, elétrons  $\pi$  de ligações e elétrons de valência  $n$  (não ligantes). Isto requer que a molécula contenha pelos menos um grupo funcional insaturado ( $C = C$ ,  $C = O$ , por exemplo) para fornecer os orbitais moleculares  $\pi$  e  $\pi^*$  ou  $n$  e  $\pi^*$ . Tal centro de absorção é chamado cromóforo, sendo responsável principalmente pelas transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ . Estas resultam da absorção de radiações eletromagnéticas que se enquadram em uma região espectral experimentalmente conveniente, ao contrário das transições  $n \rightarrow \sigma^*$  e  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  que requerem geralmente radiações mais energéticas ( $\lambda < 200$  nm)<sup>18,25,26</sup>.

As bandas de absorção podem ser caracterizadas por dois parâmetros fundamentais: a posição e a intensidade. A posição corresponde normalmente ao “ $\lambda$ ” da radiação eletromagnética responsável pela transição eletrônica, enquanto a intensidade depende, entre outros fatores, da energia dos orbitais moleculares e probabilidade de transição.

A energia necessária para as transições eletrônicas envolvendo a absorção de radiação UV-Vis depende primariamente do tipo de ligação (ou seja, da presença de cromóforo) e, por último, da estrutura molecular. Todavia, é possível ocorrerem mudanças significativas na posição e intensidade das bandas em decorrência de, por exemplo, uma conjugação entre ligações duplas ou quando o cromóforo  $C = C$  encontra-se conjugado com um grupo  $C = O$  na estrutura da molécula e vice-versa.

As moléculas quando expostas a radiação ultravioleta, visível sofrem três tipos diferentes de transições quantizadas quando excitadas pela radiação. Para a radiação ultravioleta e visível, a excitação envolve a promoção de elétrons presentes em um orbital

molecular ou atômico de baixa energia para um orbital de maior energia. Além das transições eletrônicas, as moléculas apresentam dois tipos adicionais de transições induzidas por radiação: transições vibracionais e transições rotacionais.

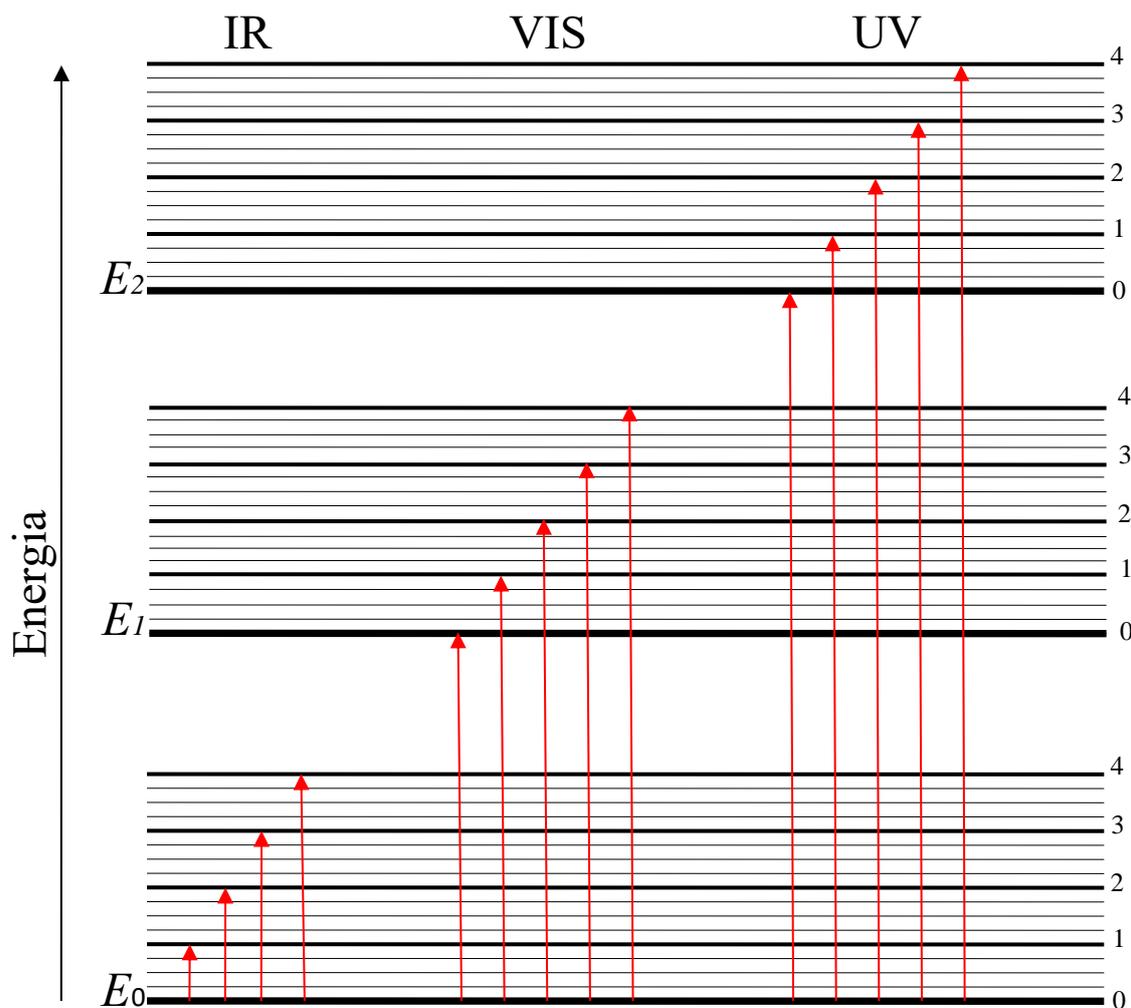
Em um processo de transição eletrônica a Energia eletrônica  $E_{el}$  envolve a transferência de um elétron de um orbital para outro. Na fig. 3 esta representado um diagrama parcial de energia que mostra alguns processos que ocorrem quando uma molécula absorve a radiação infravermelha (IR), visível (VIS) e ultravioleta (UV). Os níveis de energia eletrônica estão representados por  $E_0$ ,  $E_1$  e  $E_2$ , onde  $E_0$  é a energia do estado fundamental e  $E_1$  e  $E_2$  indica os dois próximos de muitos estados eletrônicos excitados de uma molécula,

As transições de energia vibracionais  $E_{vib}$  ocorrem porque a molécula apresenta um número muito grande de níveis energéticos quantizados (ou estados vibracionais) associados com as ligações que mantêm a molécula unida. Esses níveis de energia se encontram entre os níveis de energia eletrônica e são indicados pelos números de 0 a 4 na fig.3.

Entre os níveis de energia vibracionais existe uma quantidade enorme de estados rotacionais que são associados à movimentação rotacional da molécula ao redor do seu centro de gravidade, a energia associada a esses estados é denominada energia rotacional  $E_{rot}$ .<sup>18</sup>

Os estados de energia  $E_{el}$ ,  $E_{vib}$ ,  $E_{rot}$  estão apresentados no diagrama de energia da figura 3.

Figura 3. Diagrama de níveis energéticos mostrando algumas mudanças que ocorrem durante a absorção da radiação infravermelha (IR), visível (VIS) e ultravioleta (UV) por espécies moleculares.



Fonte: Adaptado de Skoog (2016)

Podemos expressar a energia total de excitação de uma molécula, com boa aproximação, como a soma das energias de excitações parciais dos níveis eletrônico, vibracional e rotacional:

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad \text{Eq. 9}$$

Um esquema básico da representação de espectrômetro de absorção na faixa do ultravioleta e visível está representado na figura abaixo.

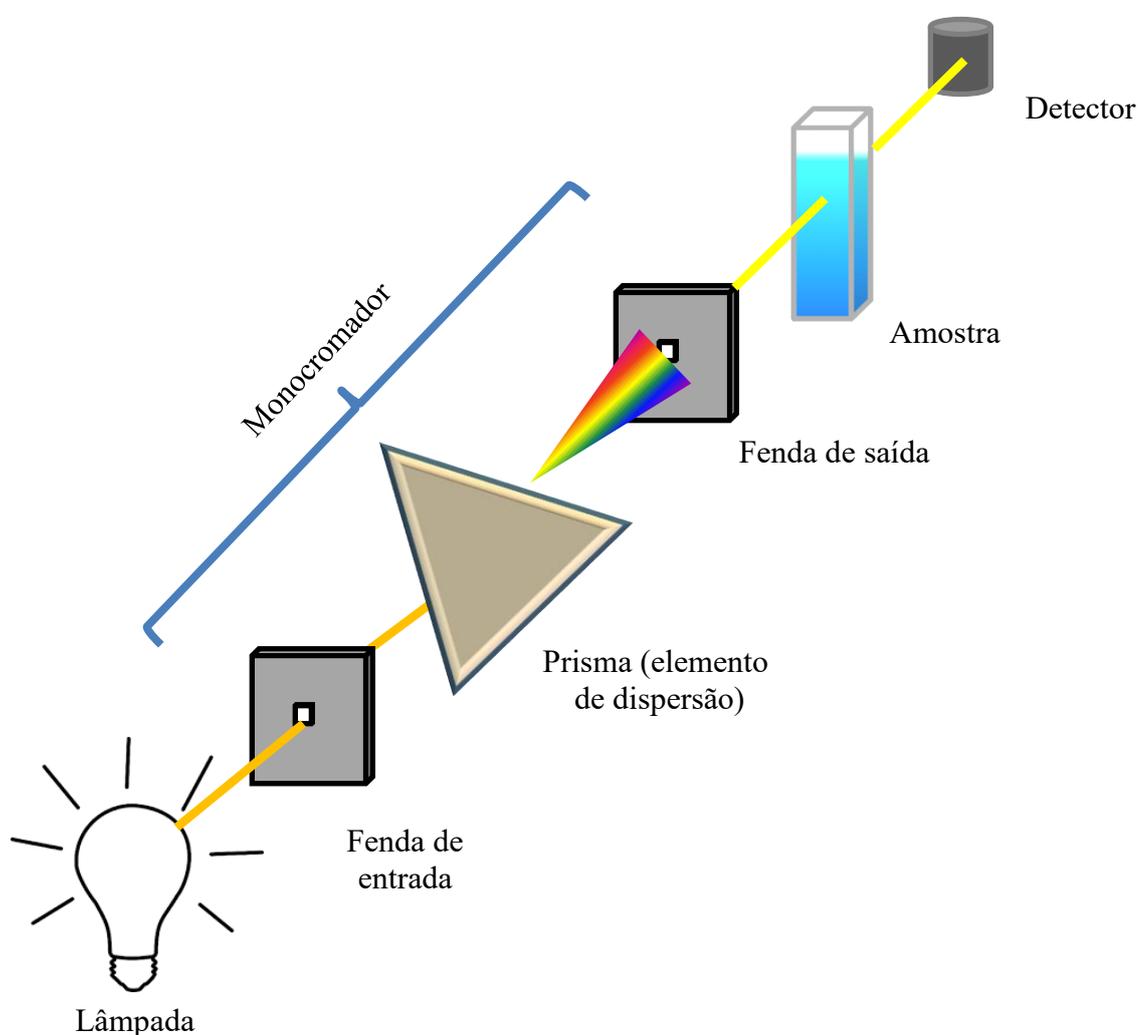
No campo da indústria farmacêutica a espectrofotometria de absorção na região do

ultravioleta-visível (UV-Vis) alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios de controle de qualidade.<sup>27</sup>

Embora extremamente utilizada, a pouca seletividade tem sido um dos maiores desafios dessa técnica para análise de matrizes complexas como os extratos vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse.<sup>28</sup>

Um esquema básico de espectrômetro de absorção UV-Vis pode ser observado na figura 4.

Figura 4. Esquema básico das partes de um espectrômetro de absorção UV-Vis



Fonte: Autor

## 5.1 TRANSMITÂNCIA

Quando moléculas e íons presentes são capazes de absorver fótons e são então promovidos do estado fundamental para um estado excitado mais energético, a quantidade de energia absorvida é proporcional à concentração da espécie na solução, possibilitando desta forma a sua quantificação.<sup>18,26</sup>

A transmitância  $T$  pode ser determinada a partir da seguinte relação:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Eq. 10}$$

( $P_0$  é a potência do feixe de radiação incidente e  $P$  é a potência do feixe de radiação após atravessar a solução contendo a espécie de interesse)

## 5.2 ABSORBÂNCIA (LEI DE LAMBERT-BEER)

Absorbância, também chamada de absorvância, é a capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações em uma frequência específica. Usualmente, tal propriedade é empregada na análise de soluções em espectroscopia.

A absorbância ( $A$ ) é definida como:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad \text{Eq. 11}$$

De acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorbância também pode ser expressa pela Equação.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a b c \quad \text{Eq. 12}$$

Na equação acima  $a$  é a constante de proporcionalidade denominada absortividade,  $b$  é o caminho óptico do meio absorvente e  $c$  é a concentração de uma espécie absorvente.

A Lei de Lambert-Beer é rigorosamente obedecida quando uma única espécie gera a absorção observada.

No entanto, essa lei pode não ser obedecida quando diferentes formas de moléculas absorventes estão em equilíbrio, quando o soluto e o solvente formam complexos por meio de algum tipo de associação, quando existe equilíbrio térmico entre o estado eletrônico

fundamental e um estado excitado de baixa energia, ou quando compostos fluorescentes ou compostos que são modificados pela irradiação estão presentes.<sup>18,26</sup>

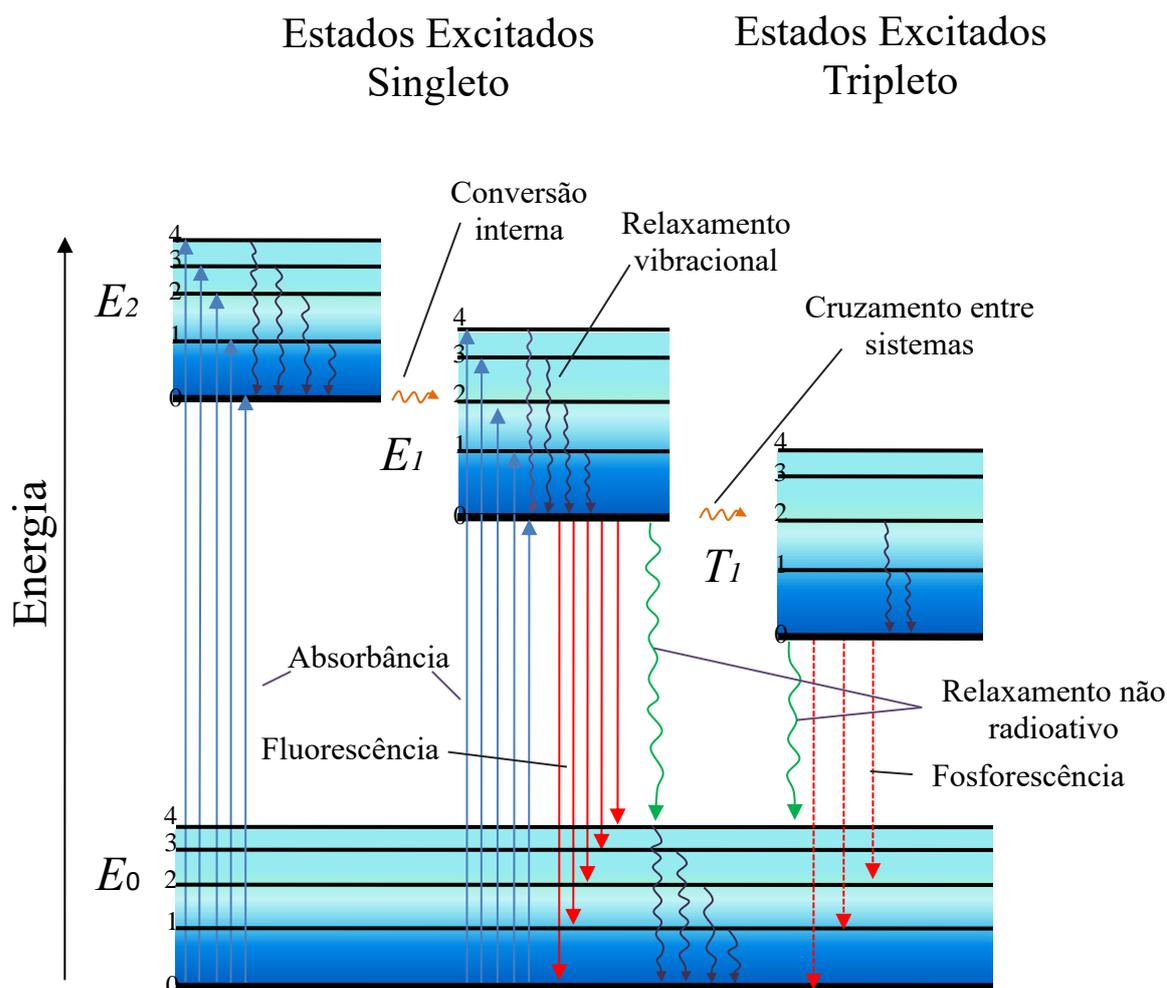
## 6 FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

A espectrometria de fluorescência, também conhecida como fluorometria ou espectrofluorometria, é um tipo de espectroscopia eletromagnética que analisa a fluorescência da amostra. Envolve o uso de um feixe de luz, geralmente ultravioleta e luz visível, que excita os elétrons em moléculas de certos compostos, estes ao retornar para o estado fundamental emitem luz de baixa energia, tipicamente, mas não necessariamente, luz visível. Moléculas têm vários estados energéticos também denominados como níveis de energia.

A espectroscopia de fluorescência está principalmente relacionada aos estados eletrônicos e vibracionais. Geralmente, as espécies examinadas terão um estado eletrônico de baixa energia e um estado eletrônico excitado de energia superior. Dentro de cada um desses estados eletrônicos contém vários estados vibracionais.

Na espectroscopia de fluorescência, a espécie é primeiro excitada, absorvendo um fóton, a partir do seu estado eletrônico fundamental  $E_0$  para um dos vários estados vibracionais de algum estado eletrônico excitado, por exemplo  $E_2$  da figura 5.

Figura 5. Diagrama de Jablonski simplificado



Fonte da imagem: autor

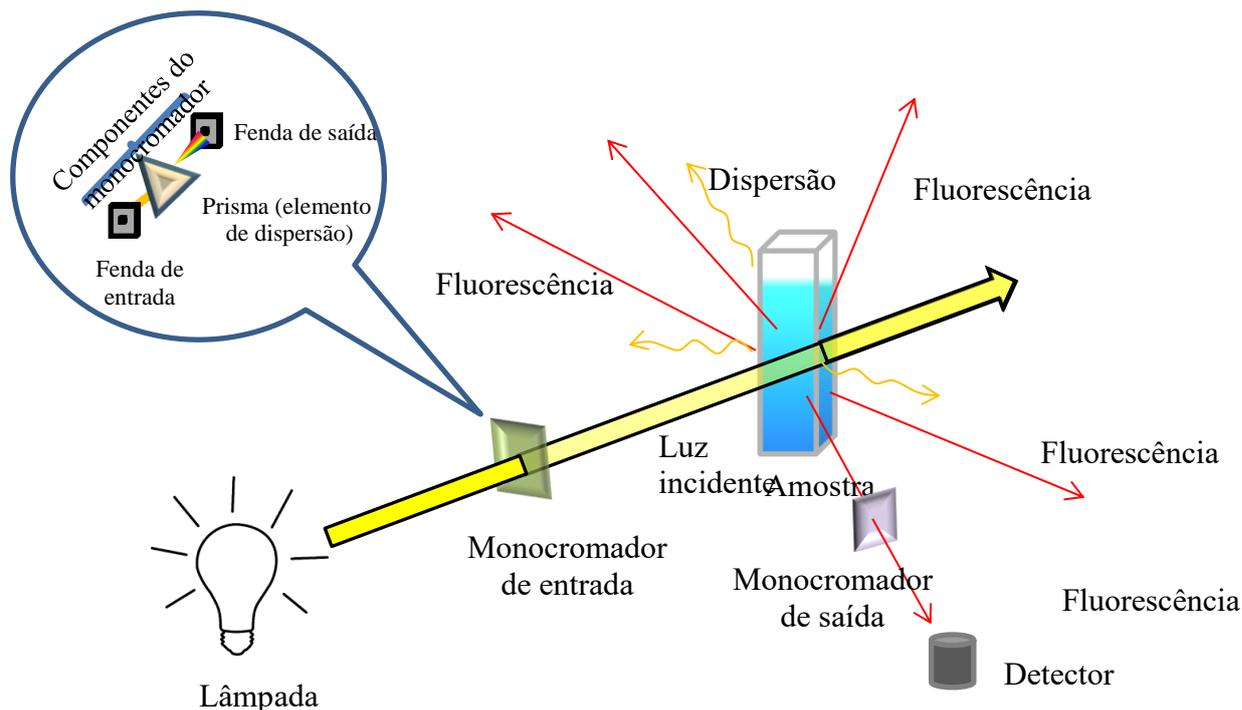
As colisões com outras moléculas causam a desexcitação molecular fazendo com que os elétrons percam energia vibracional (**relaxamento vibracional**) até atingir o estado vibracional mais baixo de  $E_2$  quando ocorre a **conversão interna** de  $E_2$  para  $E_1$ , além da **conversão externa** que envolve a transferência de energia para as moléculas do solvente, o processo de relaxação vibracional continua até o nível mais baixo de energia do primeiro estado eletrônico excitado  $E_1$ . A energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico do spin do elétron, e passa do nível  $E_1 \rightarrow E_0$ , emitindo radiação desde o nível excitado  $E_1$  para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico  $E_0$ . Os tempos de vida da fluorescência conseqüentemente são extremamente pequenos, com a luminescência cessando quase que imediatamente, por volta de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  s.

Nos compostos orgânicos, o fenômeno da fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas. Alguns dos fluoróforos típicos são a quinina, a fluoresceína, a rodamina. A quinina, encontrada na água tônica, foi o primeiro fluoróforo estudado e foi o responsável por estimular o desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros que surgiram somente em 1950. Muitos fluoróforos são encontrados nos dias atuais. Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, tais como o antraceno e o perileno, são também fluorescentes. Em proteínas o fluoróforo dominante é o grupo do triptofano que absorve próximo de 280 nm e emite próximo de 340 nm.

No entanto uma transição menos provável pode ocorrer durante o processo de relaxamento, são os decaimentos fosforescentes, eles ocorrem quando a uma mudança do número quântico do spin do elétron, envolvendo transições proibidas de elétrons que se encontravam em um estado tripleto para o estado fundamental singleto ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). O tempo de vida da radiação fosforescente é mais longo podendo variar entre  $10^{-4}$  e 10 s.

Os fenômenos de emissões fluorescentes e fosforescentes concorrem entre si, além dos processos paralelos já citados de desativação como a conversão interna e externa, e o relaxamento vibracional. Na figura 6 está representado um esquema básico de um espectrofluorímetro.<sup>18,25,26</sup>

Figura 6. Esquema básico de um espectrofluorímetro



Fonte da imagem: Autor

## 7. CORANTES

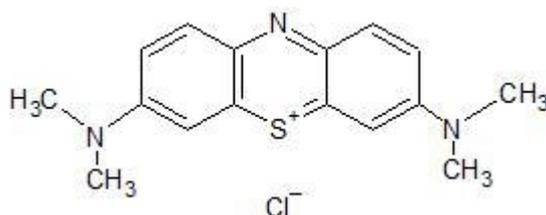
### 7.1 AZUL DE METILENO

O azul de metileno é um composto aromático heterocíclico, sólido verde escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, inodoro, com fórmula molecular:  $C_{16}H_{18}ClN_3S$  e massa molar 319.85 g/mol.

O azul de metileno (AM), que já foi muito utilizado em humanos, segundo Granick, Heckler e Jones (1987)<sup>29</sup>, tem sido usado no tratamento de metahemoglobinemia, choque séptico e outras patologias. Em doses baixas e não concentradas, Fogler e Golembe (1978)<sup>30</sup> demonstram poder ser usada na artéria mesentérica superior para confirmar hemorragia ou malformação do intestino delgado, diagnosticada por arteriografia pré-operatória e na identificação da artéria gástrica posterior em gastrectomias, sem apresentar complicações isquêmicas ou alérgicas. Além disso, para Granick, Heckler e Jones (1987)<sup>29</sup>, o AM parece mais confiável do que outros corantes, por já ter sido exaustivamente utilizado de forma intra-arterial para localizar paratireóides, supra-renais e estruturas renais, sem apresentar reações adversas, especialmente do tipo reação anafiláticas ou necrose cutânea. O AM tem larga utilização em terapia fotodinâmica. Longo e Azevedo (2010)<sup>31</sup> demonstraram diminuição efetiva da carga bacteriana de culturas de *Escherichia coli* e de culturas polimicrobianas

derivadas de amostras de dentina cariada, também apresenta excelentes resultados quando utilizado para tratamento de câncer de pele do tipo carcinoma basocelular (CBC)<sup>32</sup>.

Figura 7. Estrutura química do azul de metileno

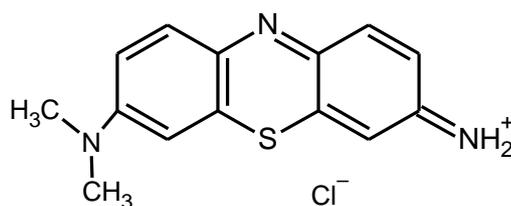


Fonte: autor

## 7.2 EOSINA AZUL DE METILENO

Também denominado de corante Wright-Giemsa e composto e classificado como policromático, é um composto neutro dos corantes azul II (mistura não oxidada de azul I e azul de metileno) e eosinato de azul II (corante formado pela combinação equimolar de azul I, azul de metileno e eosina amarelada). Normalmente é utilizado em citogenética vegetal<sup>33</sup>, e recentemente explorado como inativador fotodinâmico utilizado em bactérias *S. aureos*, *E. Coli* E *P. aeruginosa*<sup>34</sup>.

Fígura 8. Estrutura química da eosina azul de metileno.



Fonte: Autor

## 8 OBJETIVOS

### 8.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade do método de Calibração Multi-Energética – MEC para as análises realizadas a partir das medidas de espectroscopia molecular (absorção UV-Vis e fluorescência).

## 8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a aplicação da metodologia de calibração MEC em medidas de espectroscopia de absorção UV-Vis e Fluorescência, utilizando como analitos os corantes Azul de Metileno AM e Eosina Azul de Metileno EAM.

Determinar os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LD), Recuperação (RECP%) e Desvio Padrão Relativo (RSD%), do MEC para os analitos investigados;

Avaliar o comportamento do MEC quando utilizados em diferentes matrizes como água deionizada e metanol.

Comparar e validar os resultados obtidos pelo MEC com o método de calibração por adição de padrão.

## 9 MATERIAIS E MÉTODOS

O corante azul de metileno e eosina azul de metileno foram diluídos separadamente em água deionizada e após em metanol, todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

Para análise de espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis, Lambda 265, UV Lab Version 4.1.0, Fabricante: Perkin Elmer, utilizando a faixa de varredura de 200 a 800 nm e cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

Para a avaliação da espectroscopia molecular de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro (SCINCO FS-2, Coreia), composto por uma lâmpada de arco Xe de 150W como fonte de excitação e um fotomultiplicador R928 para a leitura da emissão de fluorescência, as medidas foram realizadas com geometria de ângulo reto (geometria de 90° entre excitação e emissão), cubeta de quartzo com quatro faces polidas e comprimento óptico de 10 mm, as amostras do azul de metileno foram excitadas a 630 nm e os espectros de fluorescência foram coletados na faixa de 640 a 800 nm e a voltagem escolhida para as medidas em água e metanol foram respectivamente 700 e 645 V para o eosina azul de metileno foram excitadas a 300 nm e coletadas as intensidades na faixa de 450 a 800 nm na voltagem de 645 V, para água e metanol foram mantidas as mesmas condições.

O background de cada solvente foi medido dez vezes e as medidas de cada solução foram realizadas três vezes para o MAP e para o MEC, o procedimento foi realizado paras

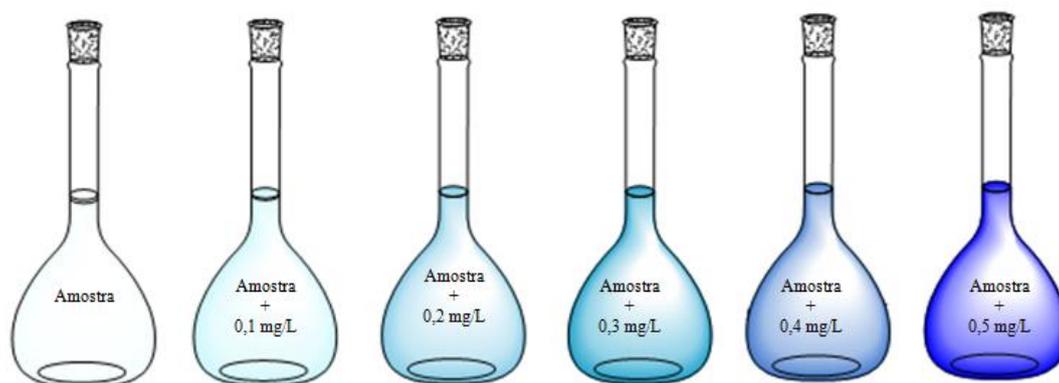
medidas de absorção e fluorescência, a média destes foram utilizadas na análise e modelagem dos dados.

## 10 METODOLOGIA

### 10.1 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO E AMOSTRA PARA O MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO (MAP)

Para o procedimento MAP primeiramente foi escolhido a água como solvente, posteriormente as medidas serão realizadas em metanol. No processo de avaliação do MAP foi estabelecido a concentração de 0,1 mg/L do corante analisado como amostra a ser investigada e posteriormente quantificada. O primeiro corante utilizado como amostra foi o **azul de metileno**. Como solução padrão foi preparada uma concentração de 1,0 mg/L do mesmo corante. Foram separados 6 balões de 10 mL, em cada balão foram adicionados 5 mL da solução contendo a amostra, no segundo balão adicionou-se 1 mL (1 $\Delta$ V) do padrão, no terceiro adicionou-se 2,0 mL (2 $\Delta$ V) de padrão, e assim, sucessivamente até completar as 5 adições da solução padrão, em seguida todos os balões tiveram seus volumes preenchidos com solventes até completar 10 mL, as distribuições volumétricas estão representadas na figura 9.

Figura 9. Balões de 10 mL representando a distribuição volumétrica da amostra e do padrão diluídos em água.



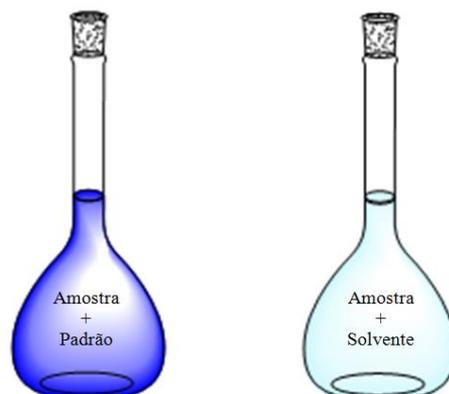
Fonte: Autor

Como o sinal do MAP depende de uma proporcionalidade direta entre a fração de amostra com a resposta do equipamento, os valores obtidos estarão em ordem crescente e proporcional a quantidade solução padrão adicionado. Para cada solução foram obtidos os valores do sinal de absorvância e a intensidade de fluorescência. A concentração na amostra foi calculada por extrapolação desta função ao sinal zero, utilizando a Eq.2. Os mesmos procedimentos foram realizados para o corante **eosina azul de metileno**.

## 10.2 PREPARO DA AMOSTRA PARA O MEC

Para a calibração MEC foi primeiramente utilizado o corante **azul de metileno** e como solvente foi utilizada água e posteriormente metanol. Foram separados dois balões de 10 mL, o primeiro balão é composto por 50%  $\text{vv}^{-1}$  da amostra (mesma amostra utilizada no MAP) e 50%  $\text{vv}^{-1}$  da solução padrão de 0,5 mg/L de AM, o segundo balão possui 50%  $\text{vv}^{-1}$  da amostra e 50%  $\text{vv}^{-1}$  do solvente. O esquema pode ser observado na figura 9.

Figura 10. Balões de 10 mL representando a distribuição volumétrica da amostra e padrão.



Fonte: Autor

A concentração do analito na amostra foi calculada a partir do coeficiente angular da curva obtida plotando-se os sinais medidos em diferentes comprimentos de onda da solução 1 no eixo das abscissas e da solução 2 no eixo das ordenadas. A concentração da amostra  $C^{Amostra}$  foi determinada a partir de equação 8.

Os mesmos procedimentos foram realizados para o corante **eosina azul de metileno**.

## 11 ESTATÍSTICA

Desvio padrão.

O desvio padrão é uma medida que expressa o grau de dispersão de um conjunto de dados, ou seja, o desvio padrão indica o quanto um conjunto de dados é uniforme.

O desvio padrão (DP) é calculado usando-se a seguinte equação:

$$DP = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{Eq. 13}$$

Onde  $\sum_i$  representa o somatório de todos os termos, desde a primeira posição ( $i=1$ ) até a posição  $n$ ,  $x_i$  representa o valor na posição  $i$  no conjunto de dados,  $\bar{x}$  é o valor médio dos dados medidos,  $n$  é quantidade de réplicas.<sup>35</sup>

Desvio padrão relativo (DPR%).

Outra medida de disseminação amplamente utilizada é o coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR%).

O DPR% é um exemplo de erro aparente, ou seja, uma estimativa de erro dividida por

uma estimativa do valor absoluto da quantidade.

$$DPR\% = 100 * \frac{DP}{\bar{x}} \quad \text{Eq. 14}$$

Onde DP é o desvio padrão das medidas e  $\bar{x}$  é o valor médio das medidas realizadas.

Erros relativos são freqüentemente usados para comparar a precisão dos resultados que têm diferentes unidades ou magnitudes, e são novamente importantes nos cálculos de propagação de erro.<sup>35</sup>

#### Ensaio de recuperação (Rec.%)

O ensaio de recuperação (Rec.%) constitui um método muito utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo.<sup>36,37</sup> O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros).

A recuperação é determinada à partir da seguintes equação:

$$Rec. \% = \frac{Concentrações_{medidas}}{Concentrações_{teóricas}} \times 100 \quad \text{Eq. 15}$$

#### Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD)

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito<sup>35, 38</sup>

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. É importante ressaltar que esta concentração é detectada com segurança porém, em contrapartida, não pode ser quantificada. É recomendado que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base, pode ser ser

expresso pela equação:

$$LD = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Eq. 16}$$

Onde  $DP$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;  $IC$  é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão, o LD pode ser determinado através da seguinte equação:

$$LQ = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Eq. 17}$$

Em que  $DP$  e  $IC$  são os mesmos descritos anteriormente.

## 12 RESULTADOS

Primeiramente foram realizadas medidas de fluorescência e absorvância dos corantes utilizados no trabalho, nas concentrações de 0,5 mg/L diluídas em água e metanol, para determinação da melhor região do espectro para realização das calibrações, os resultados se encontram nas figuras 11 à 14 a seguir.

Figura 11. Espectro de fluorescência do azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol,  $\lambda_{\text{excitação}} = 630 \text{ nm}$ .

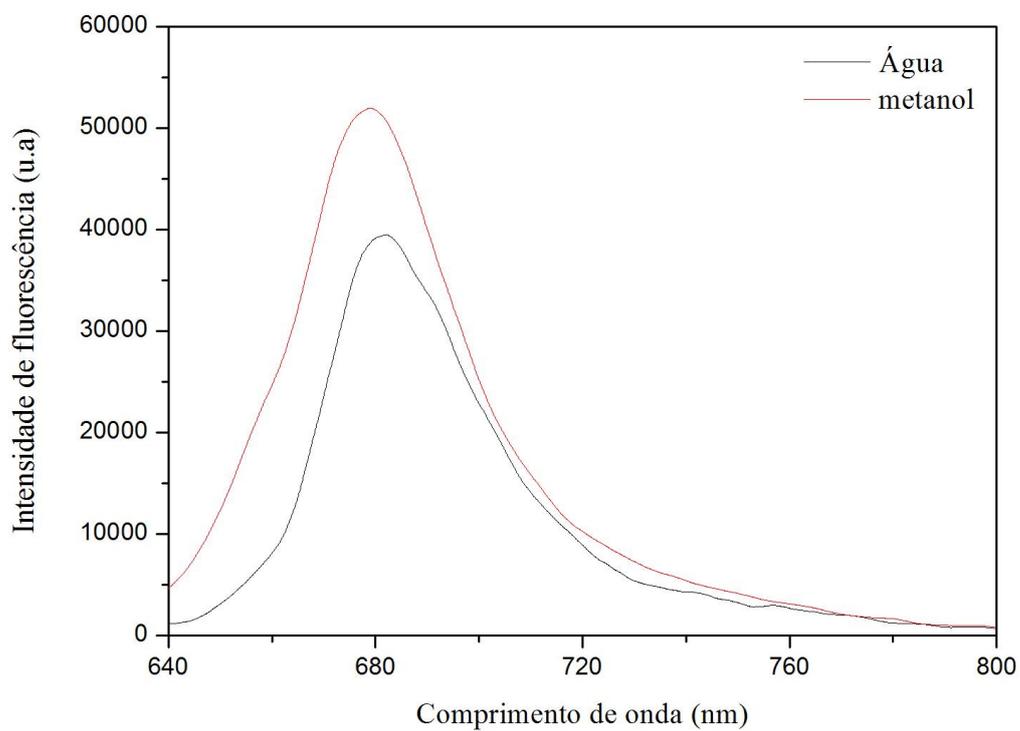


Figura 12. Espectro de absorvância do azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol.

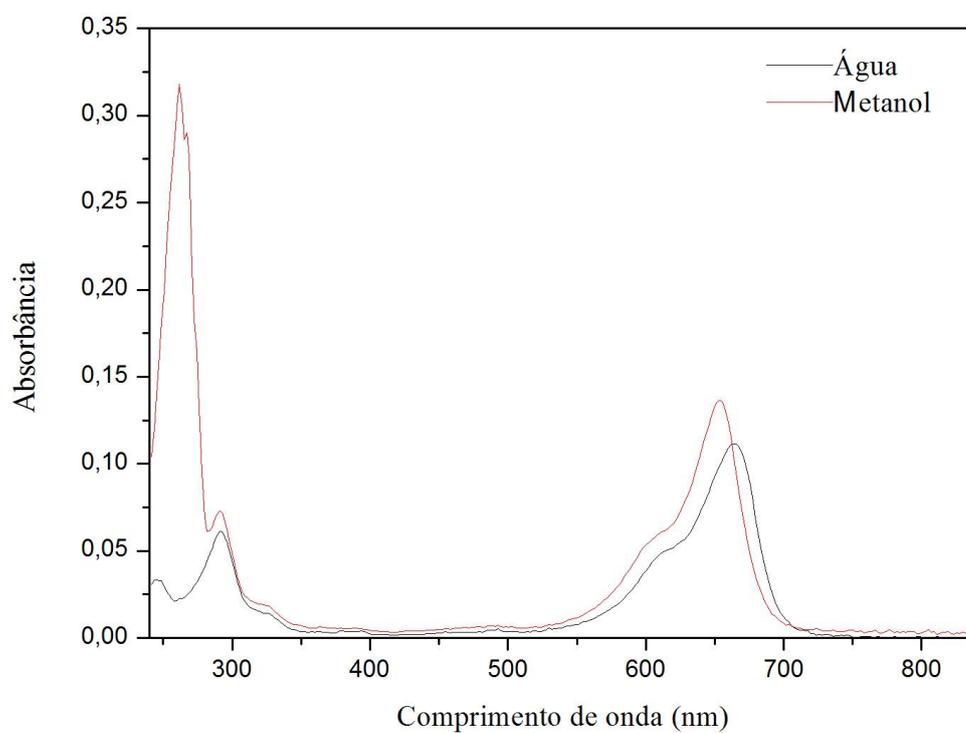


Figura 13. Espectro de fluorescência do eozina azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol,  $\lambda_{\text{excitação}} = 300 \text{ nm}$ .

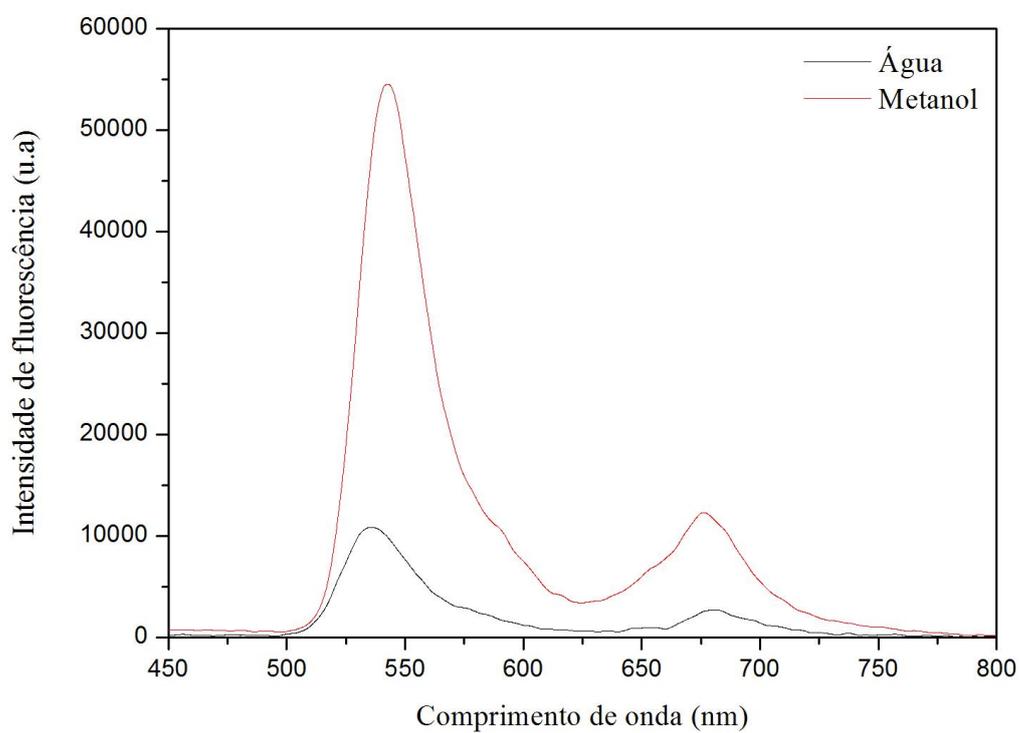
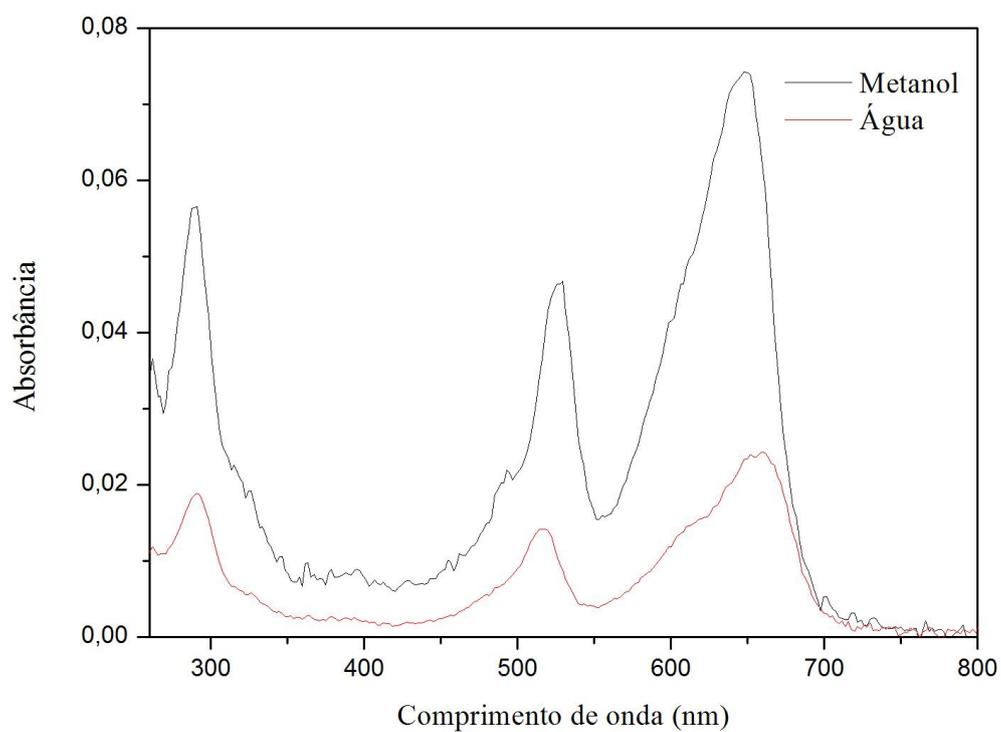


Figura 14. Espectro de absorvância do eosina azul de metileno na concentração de 0,5 mg/L diluído em água e metanol.



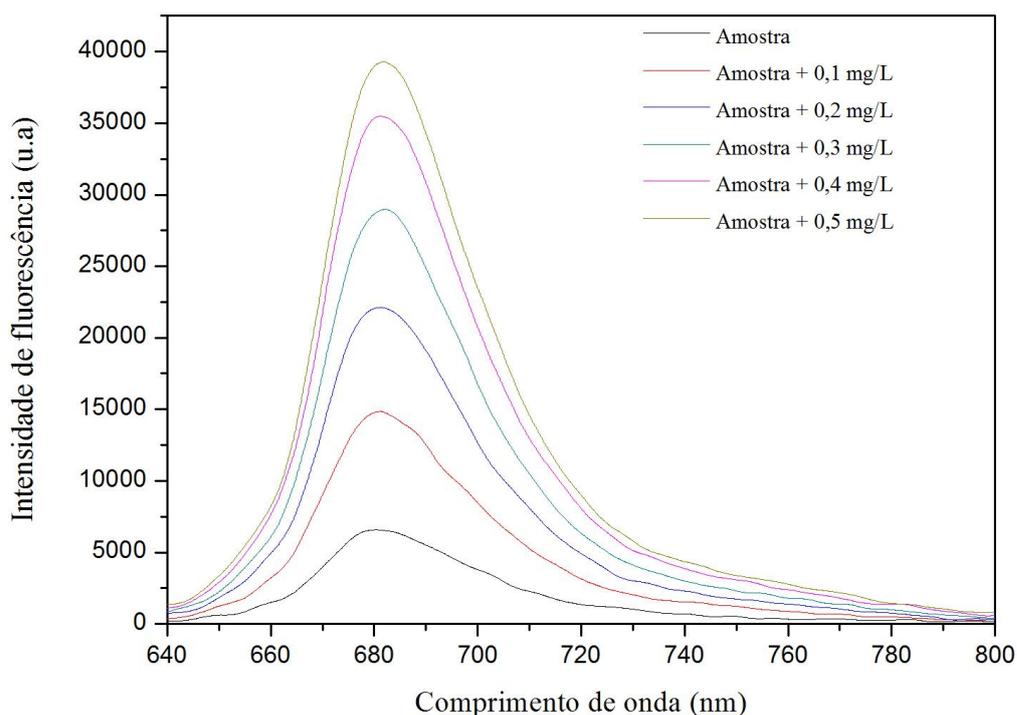
Após análise dos espectros das figuras 11, 12, 13 e 14 optamos por realizar as medidas

de calibração na região do espectro eletromagnético visível, ou seja, no intervalo de comprimento de onda de 400 à 700 nm.

## 12.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AM EM ÁGUA UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC

Primeiramente foi analisada a amostra contendo o corante azul de metileno (AM) diluído em água, através do método de adição de padrão (MAP) utilizando a espectroscopia de fluorescência e absorção na região do ultravioleta e visível.

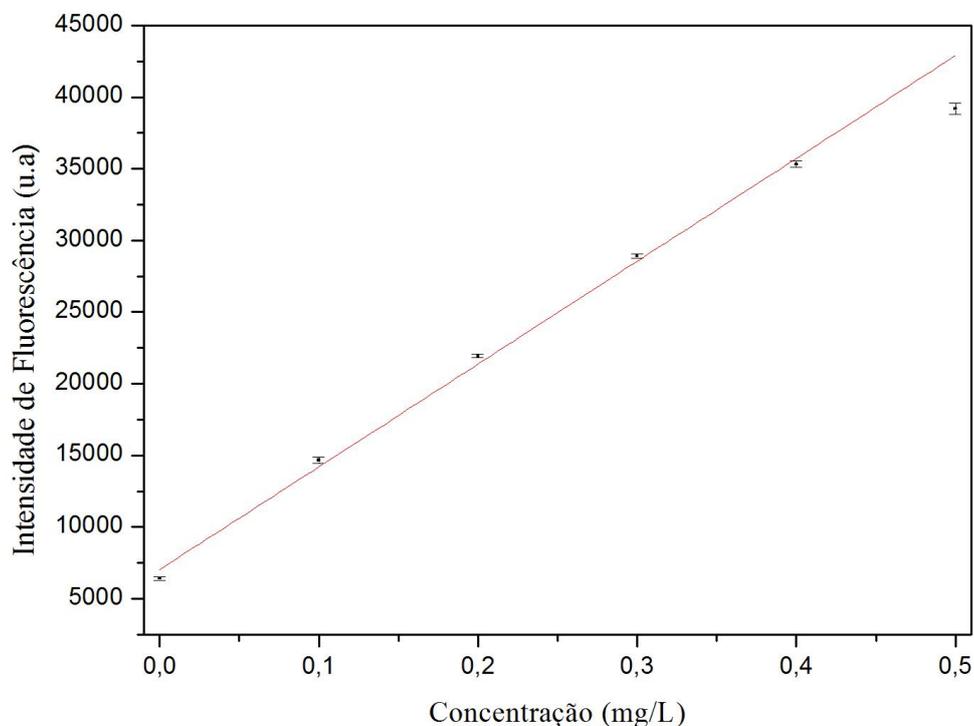
Figura 15. Espectros de fluorescência do AM em água,  $\lambda_{excitação} = 630$  nm, utilizado na análise do MAP



Através do conjunto de curvas espectrais gerados por fluorescência foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 682,2 nm, obteve-se o gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração (Figura 16) a fim de se calcular a concentração estimada de AM presente na amostra.

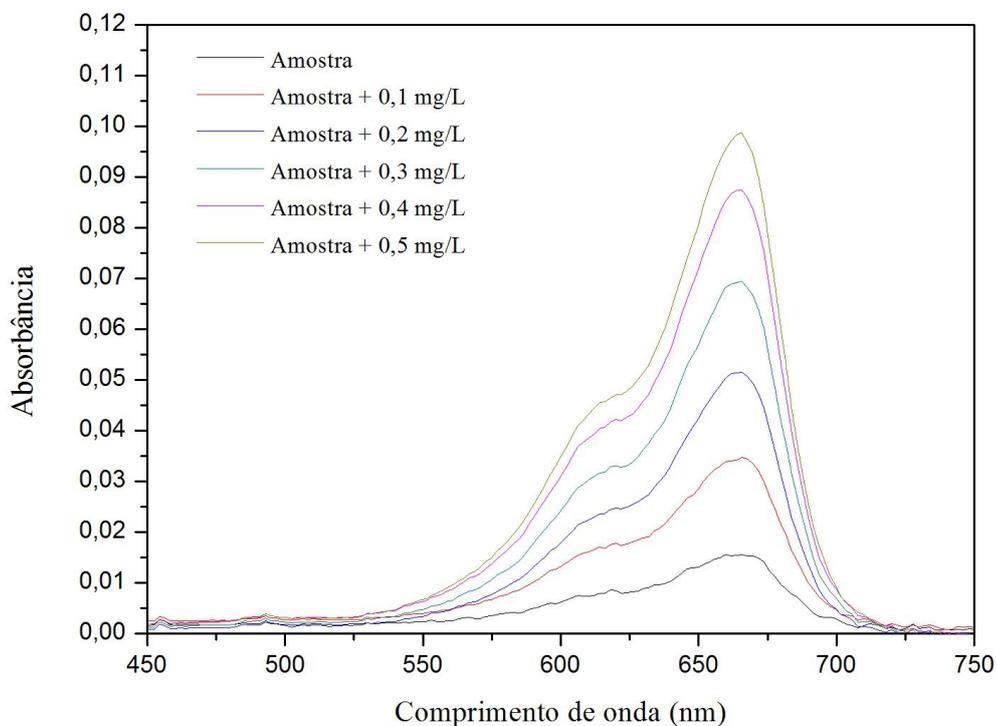
Figura 16. Intensidade de fluorescência em função da concentração de AM em água para cada

adição.



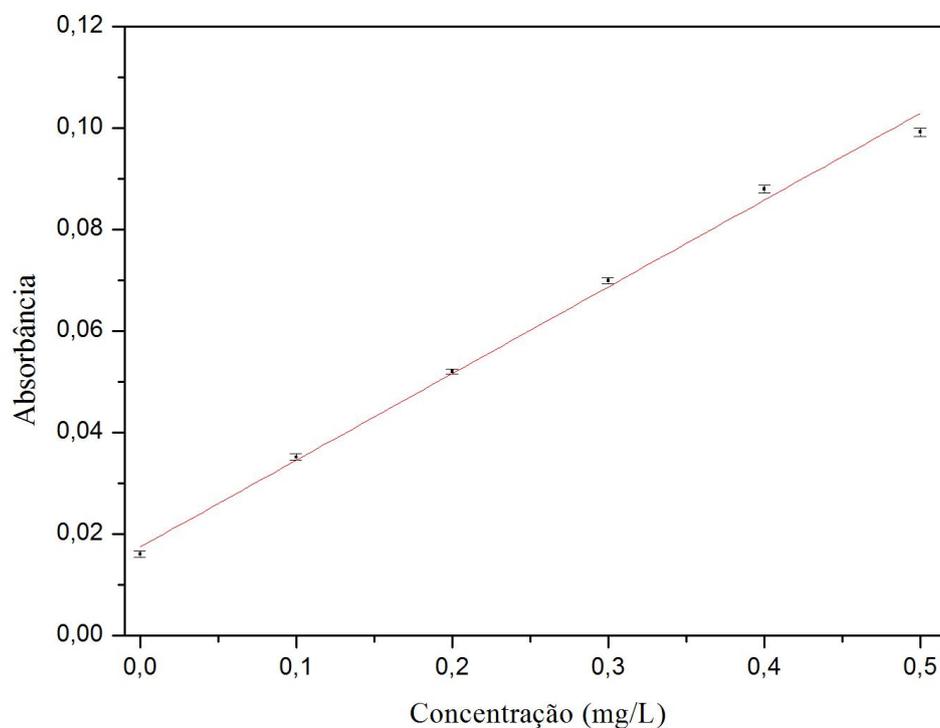
Através da equação da reta,  $y = 7029,65 + 71742,63x$ , com  $R^2 = 0,99227$ , gerada pela regressão linear da figura 16 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,098 \pm 0,005$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 5,1$  e uma  $Recp\% = 98$  do valor esperado e um LD e LQ de 0,03 e 0,06 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

Figura 17. Espectros de absorvância AM em água, utilizado na análise do MAP.



Através do conjunto das curvas espectrais gerados pela absorbância foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 653,3 nm, obteve-se o gráfico da absorbância em função da concentração (Figuras 18) a fim de se calcular a concentração estimada de AM presente na amostra.

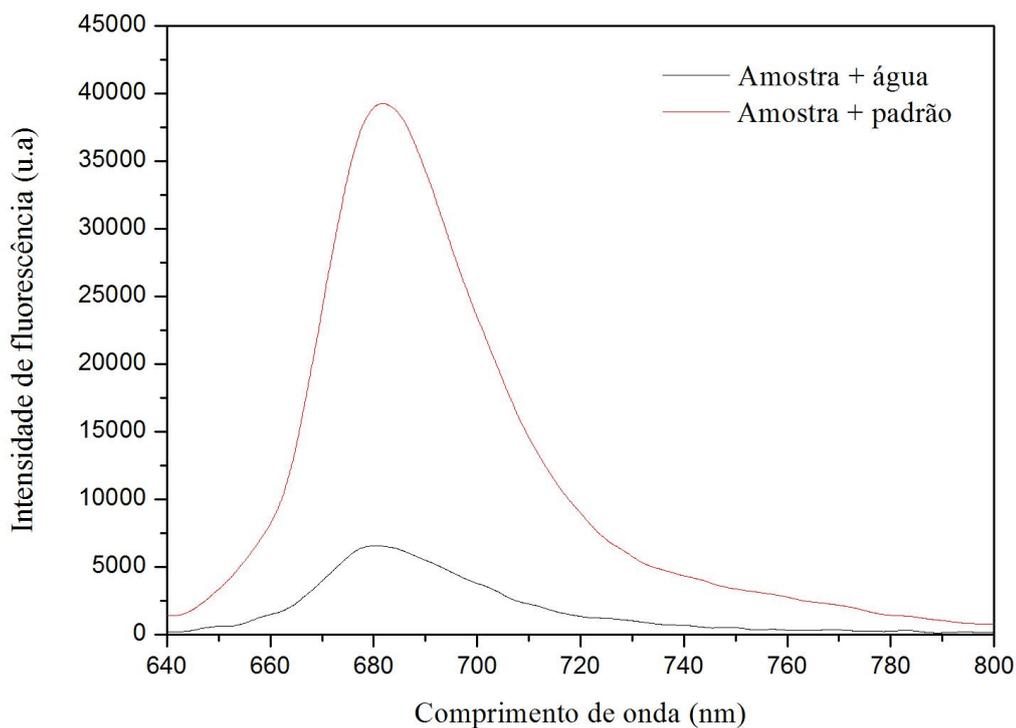
Figura 18. Absorbância em função da concentração de AM em água em cada adição.



Através da equação da reta,  $y = 0,01742 + 0,17097x$ , com  $R^2 = 0,9948$ , gerada pela regressão linear da figura 18 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,102 \pm 0,004$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 3,9$  e uma Recuperação = 102% do valor esperado e um LD e LQ de 0,03 e 0,06 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

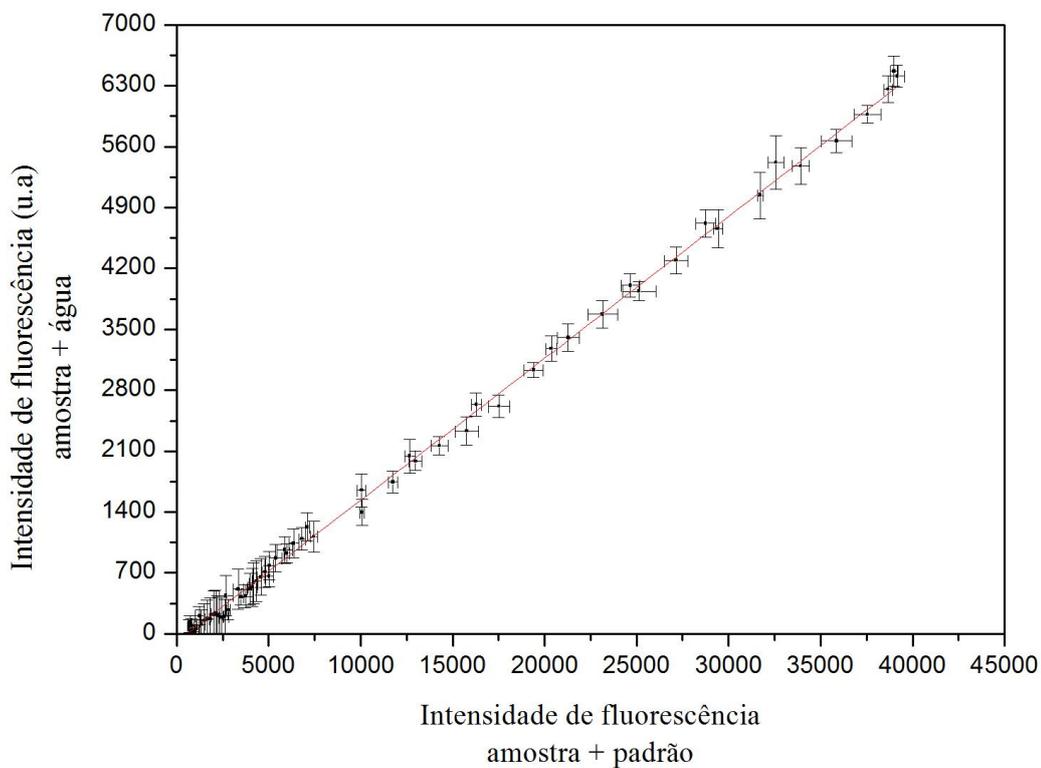
Em seguida determinamos a concentração do AM em água utilizando a metodologia do MEC. Para o MEC utilizou-se somente a solução contendo a amostra  $50\% \text{vv}^{-1}$  e padrão  $50\% \text{vv}^{-1}$  e a solução contendo a amostra  $50\% \text{vv}^{-1}$  e água  $50\% \text{vv}^{-1}$ .

Figura 19. Espectros de fluorescência do AM em água.  $\lambda_{\text{excitação}} = 630$  nm, utilizado na análise do MEC.



Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + água) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 20.

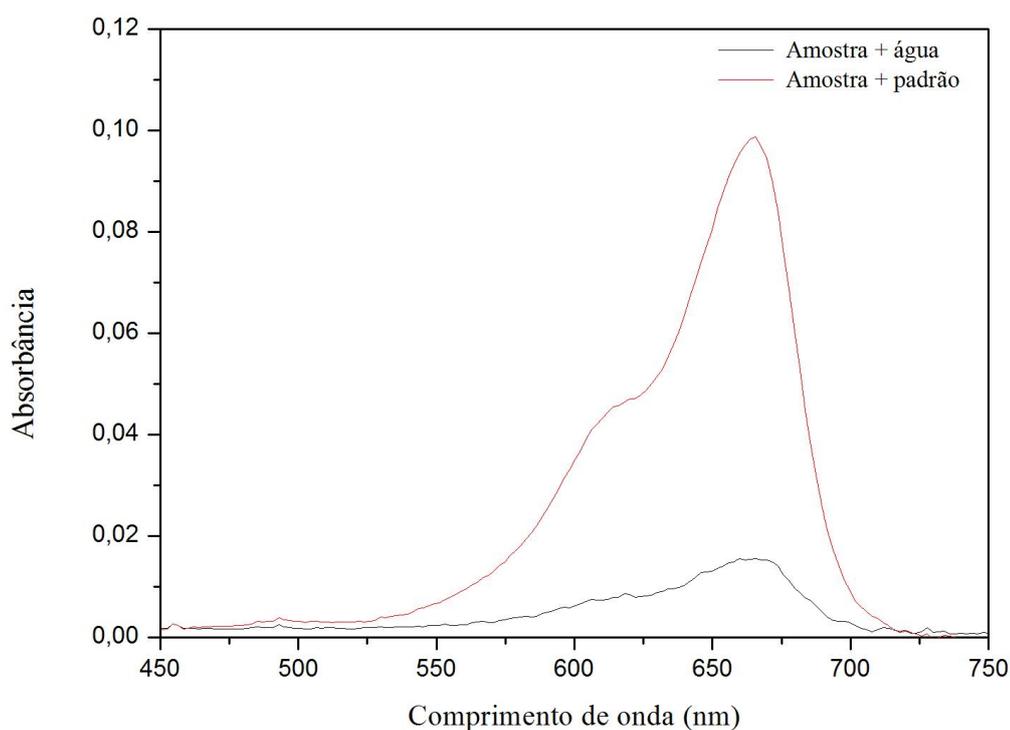
Figura 20. Intensidade de fluorescência da solução (amostra + água) vs. solução (amostra + padrão).



Através da equação da reta,  $y = -92,35525 + 0,163x$ , com  $R^2 = 0,9984$ , gerada pela

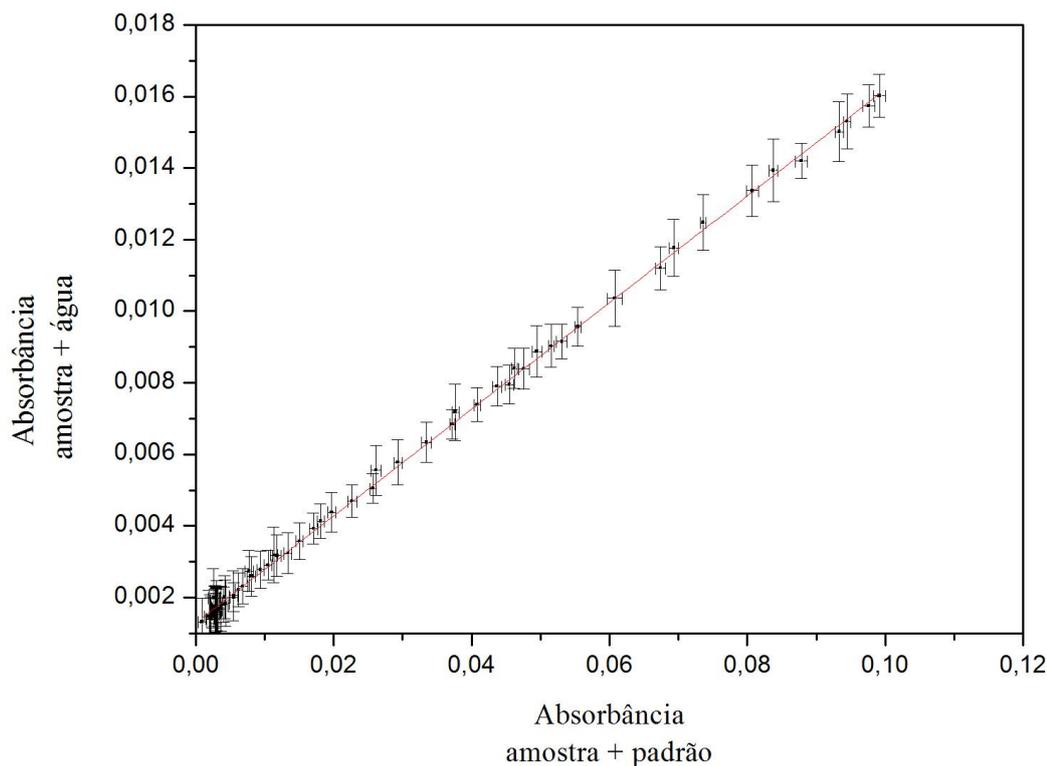
regressão linear da figura 20 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,097 \pm 0,005$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 5,2$  e uma Recuperação = 97% do valor esperado e um LD e LQ de 0,003 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

Figura 21. Espectro Espectros de absorvância do AM em água, utilizado na análise do MEC



Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + água) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 22.

Figura 22. Absorvância da solução (amostra + água) vs. solução (amostra + padrão).



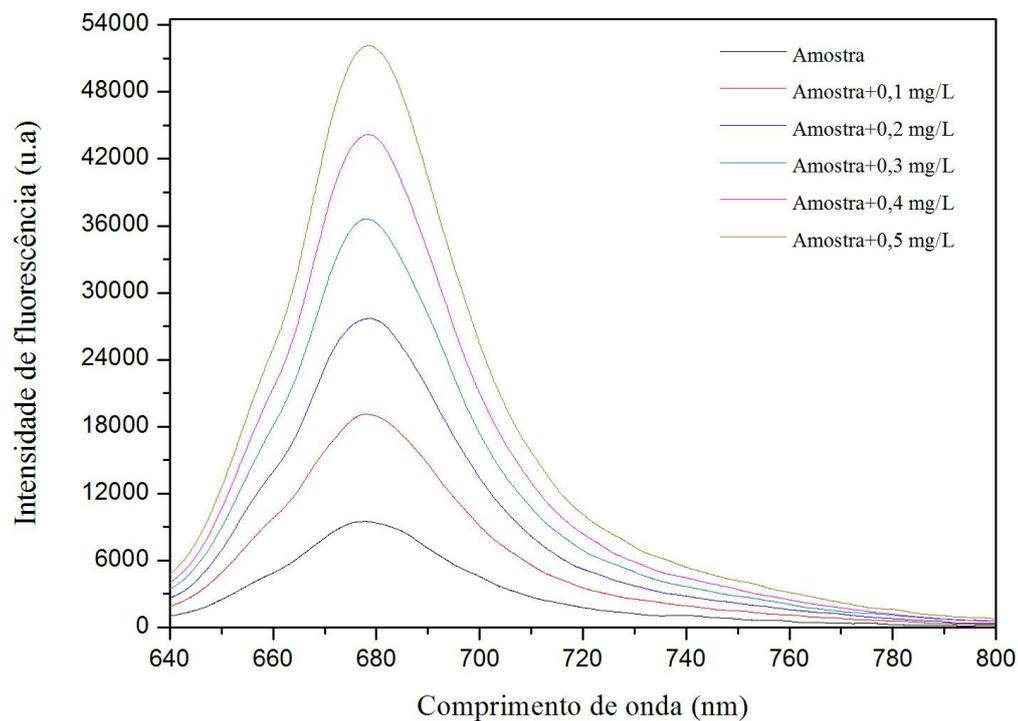
Através da equação da reta,  $y = 0,0013 + 0,1490x$ , com  $R^2 = 0,99909$ , gerada pela regressão linear da figura 22 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,088 \pm 0,006$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 6,8$  e uma Recuperação = 88% do valor esperado e um LD e LQ de 0,002 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

## 12.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AM EM METANOL UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC

Primeiramente foi analisada a amostra contendo o corante azul de metileno (AM) diluído em metanol, através do método de adição de padrão (MAP) utilizando a espectroscopia de fluorescência e absorção na região do ultravioleta e visível.

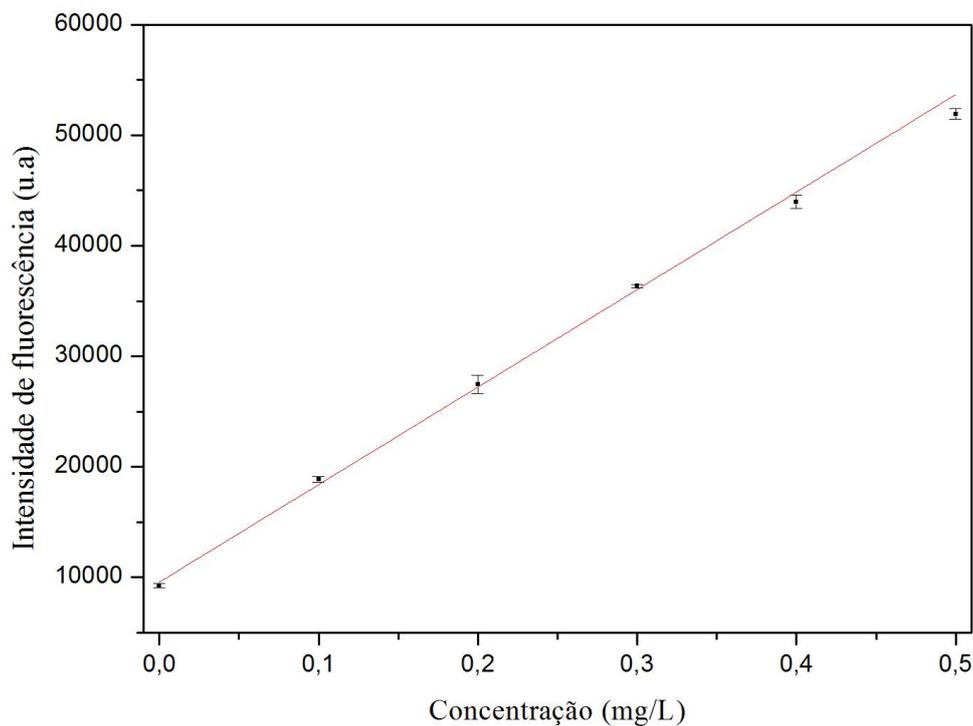
Figura 23. Espectro de fluorescência do AM em metanol,  $\lambda_{excitação} = 630$  nm, para análise pelo

MAP.



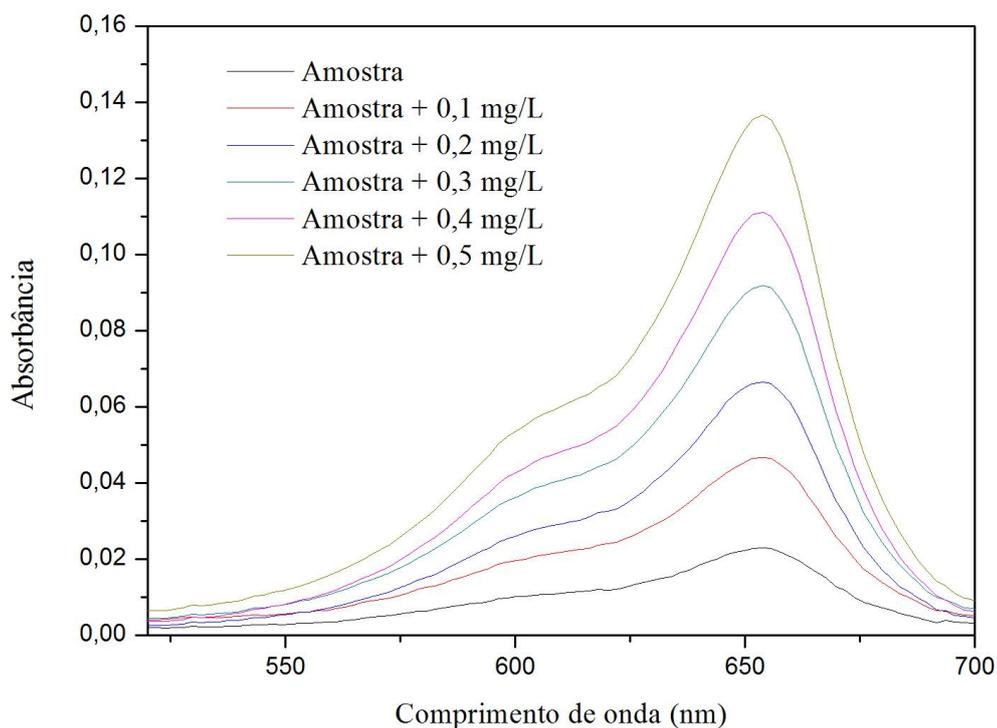
Através do conjunto de curvas espectrais gerados por fluorescência foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 678,6nm, obteve-se o gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração (Figura 24) a fim de se calcular a concentração estimada de AM presente na amostra.

Figura 24. Intensidade de fluorescência do AM em água em função da concentração em cada adição.



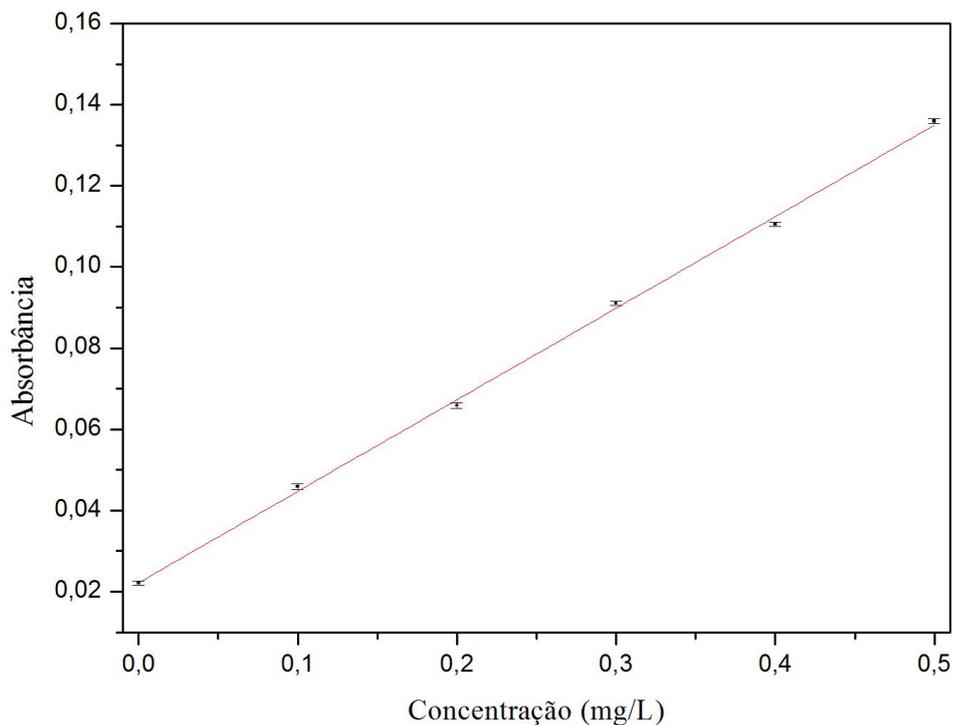
Através da equação da reta,  $y = 9564,54732 + 88199,33133x$  com  $R^2 = 0,99819$ , gerada pela regressão linear da figura 24 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,108 \pm 0,002$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um DPR% = 1,9 e uma Recp% = 108 do valor esperado e um LD e LQ de 0,02 e 0,06 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

Figura 25. Espectros de absorvância do AM em metanol, para análise do MAP.



Através do conjunto das curvas espectrais gerados pela absorbância foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 665,7 nm, obteve-se o gráfico da absorbância em função da concentração (Figuras 26) a fim de se calcular a concentração estimada de AM presente na amostra.

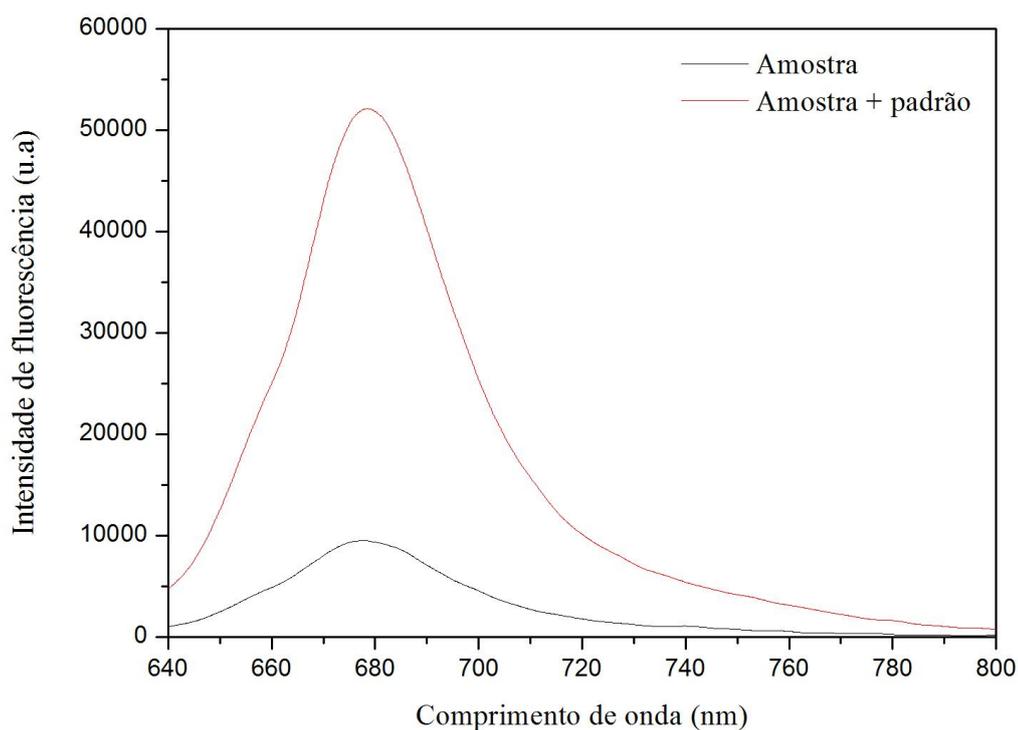
Figura 26. Sinal de absorbância gerado pela análise do MEC para o corante AM em metanol.



Através da equação da reta,  $y = 0,0222 + 0,22553x$ , com  $R^2 = 0,99882$ , gerada pela regressão linear da figura 26 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,098 \pm 0,002$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 2,0$  e uma  $Recp\% = 98$  do valor esperado e um LD e LQ de 0,004 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

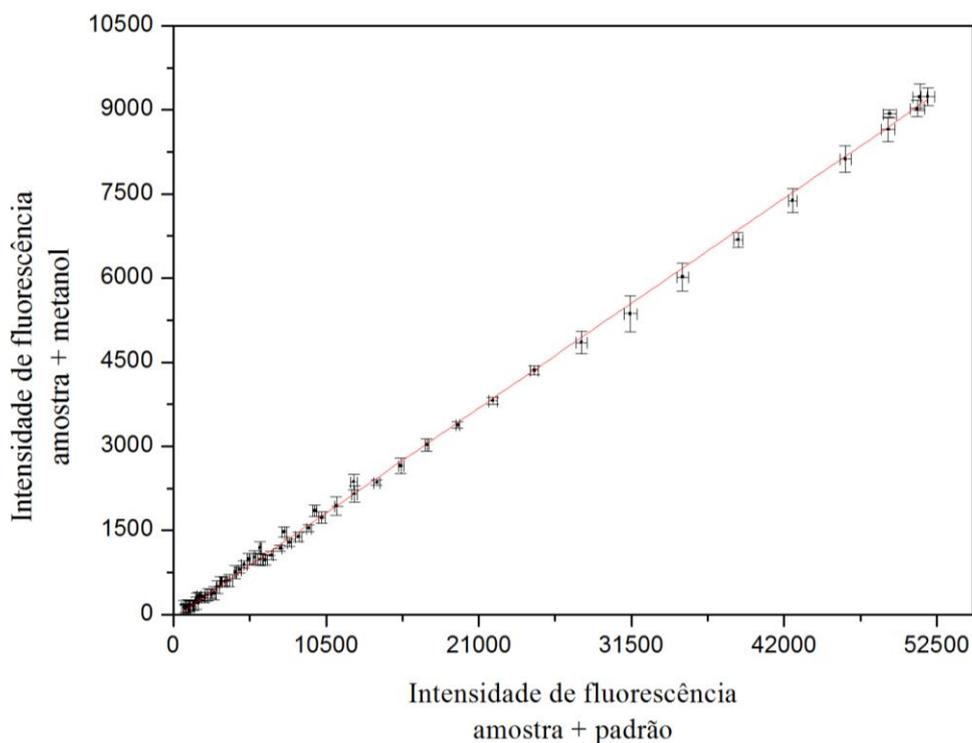
Para determinação da concentração do AM em metanol utilizando a metodologia do MEC utilizou-se somente a solução contendo a amostra  $50\% vv^{-1}$  e padrão  $50\% vv^{-1}$  e a solução contendo a amostra  $50\% vv^{-1}$  e água  $50\% vv^{-1}$ .

Figura 27. Espectro de fluorescência do AM em metanol,  $\lambda_{excitação} = 630$  nm, para análise do MAP.



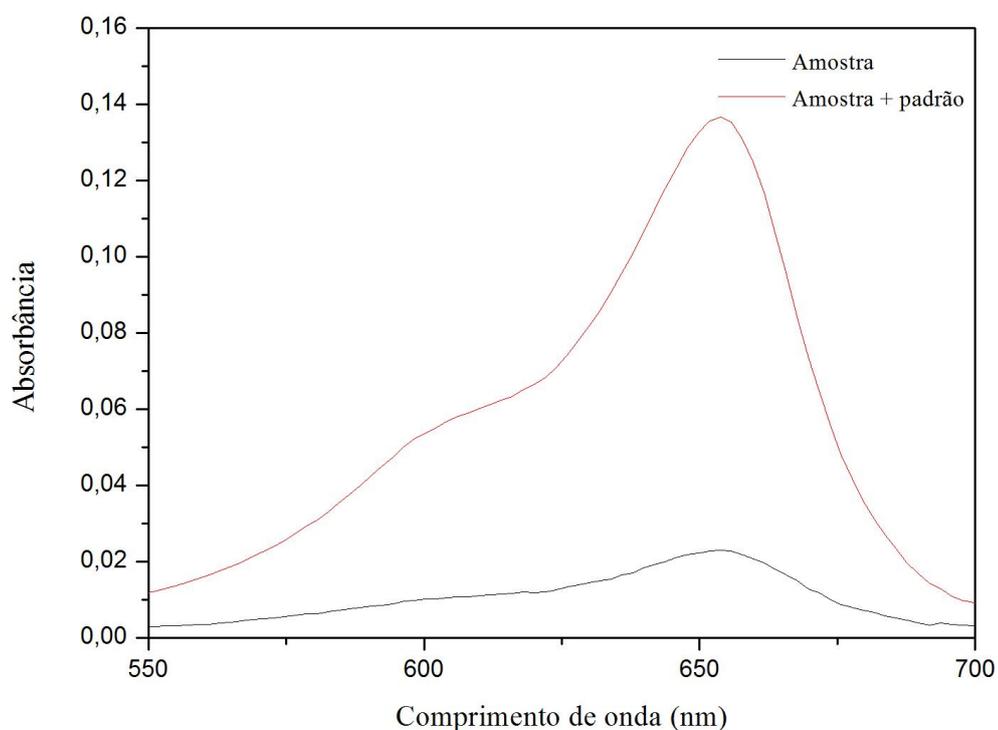
Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + metanol) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 28.

Figura 28. Intensidade de fluorescência do AM em metanol para a solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão).



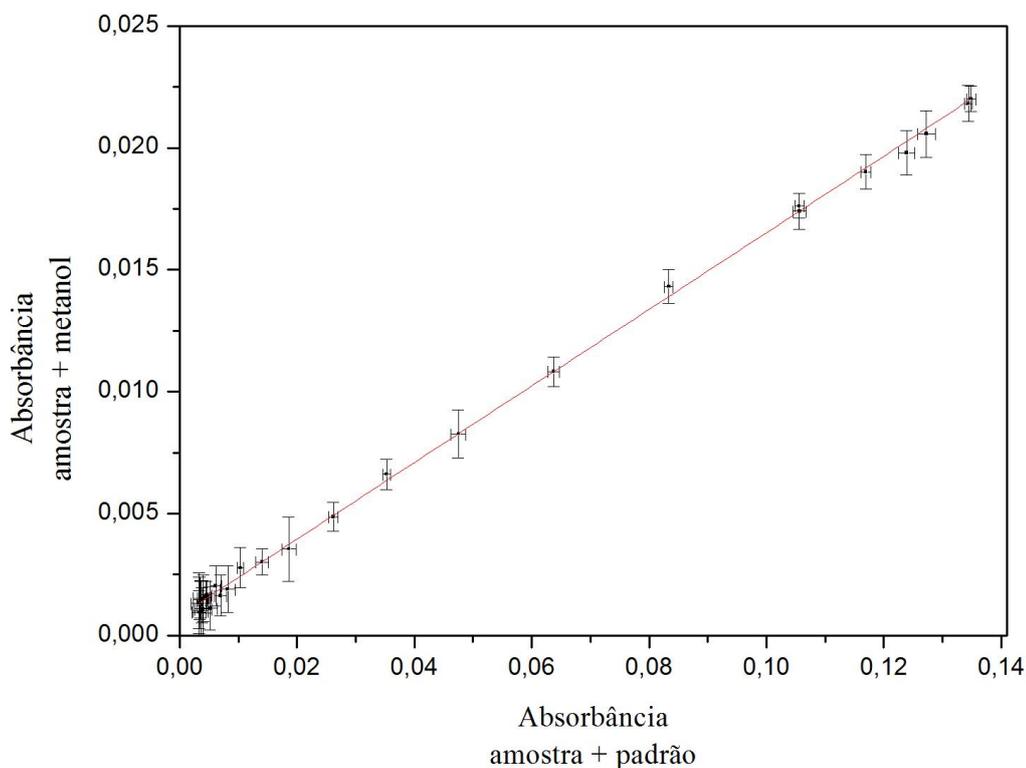
Através da equação da reta,  $y = -57,81794 + 0,17812x$ , com  $R^2 = 0,99852$ , gerada pela regressão linear da figura 28 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,108 \pm 0,002$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um DPR% = 1,9, e uma Recuperação = 108% do valor esperado e um LD e LQ de 0,02 e 0,06 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

Figura 29. Espectro de absorbância do AM em metanol, utilizado na análise do MEC.



Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + metanol) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 30.

Figura 30. Sinal de absorvância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para o AM em metanol.



Através da equação da reta,  $y = 0,0081 + 0,15717x$ , com  $R^2 = 0,99923$ , gerada pela regressão linear da figura 30 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,093 \pm 0,002$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 2,2$  e uma Recuperação = 93% do valor esperado e um LD e LQ de 0,004 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

### 12.3 RESUMO DOS RESULTADOS PARA O AM.

Tabela 1. Resumo dos resultados do corante AM adquiridos por espectroscopia de fluorescência e absorção UV-Vis utilizando o MAP e o MEC.

Matriz	Fluorescência				Absorção			
	Água		Metanol		Água		Metanol	
Método	MAP	MEC	MAP	MEC	MAP	MEC	MAP	MEC
Concentração (mg/L)	0,098	0,097	0,108	0,108	0,102	0,088	0,098	0,093
R <sup>2</sup>	0,99227	0,9984	0,99819	0,99852	0,9948	0,99909	0,99882	0,99923
Desv. Padrão	0,005	0,005	0,002	0,002	0,004	0,006	0,002	0,002
DPR%	5,1	5,2	1,9	1,9	3,8	6,8	2	2,2
Rec.%	98	97	108	108	102	88	98	93
LD (mg/L)	0,03	0,003	0,02	0,02	0,03	0,002	0,004	0,004
LQ (mg/L)	0,06	0,01	0,06	0,06	0,06	0,01	0,01	0,01

Através da tabela 1 podemos verificar a relação entre o MEC e MAP para a análise de corante AM em água utilizando a espectroscopia de fluorescência, os valores de concentração encontrados para o MEC e MAP foram respectivamente  $0,097 \pm 0,005$  e  $0,098 \pm 0,005$  mg/L, como os valores de DPR são os mesmos 5,1% podemos dizer que os valores de concentração são praticamente iguais. Os valores de R<sup>2</sup> para o MEC de 0,99819 foram levemente superiores ao do MAP de 0,99227 indicando melhor linearidade de curva de calibração para o MEC, o ensaio de recuperação (REC%) apresentou praticamente o mesmo resultado para o MAP 98% contra 97% do MEC, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o MEC foram 0,003 e 0,01 mg/L respectivamente indicando maior sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,03 e 0,06 mg/L respectivamente.

Ainda analisando a tabela 1 podemos verificar os valores de concentração do AM na mostra em metanol, utilizando a fluorescência, os valores para o MEC e MAP são iguais à  $0,108 \pm 0,002$  mg/L, portanto ambas as técnicas possuem o mesmo desvio padrão relativo de 1,9%. Com relação aos valores de R<sup>2</sup> o MEC e o MAP apresentaram os valores de 0,99582 e 0,99819 respectivamente indicando leve superioridade na linearidade da curva de calibração para o MAP, o ensaio de recuperação para o MEC e para MAP também se mantiveram iguais no valor de 108% e os valores de LQ e LQ se mantiveram iguais para ambas as técnicas no

valores de 0,02 e 0,06 mg/L respectivamente.

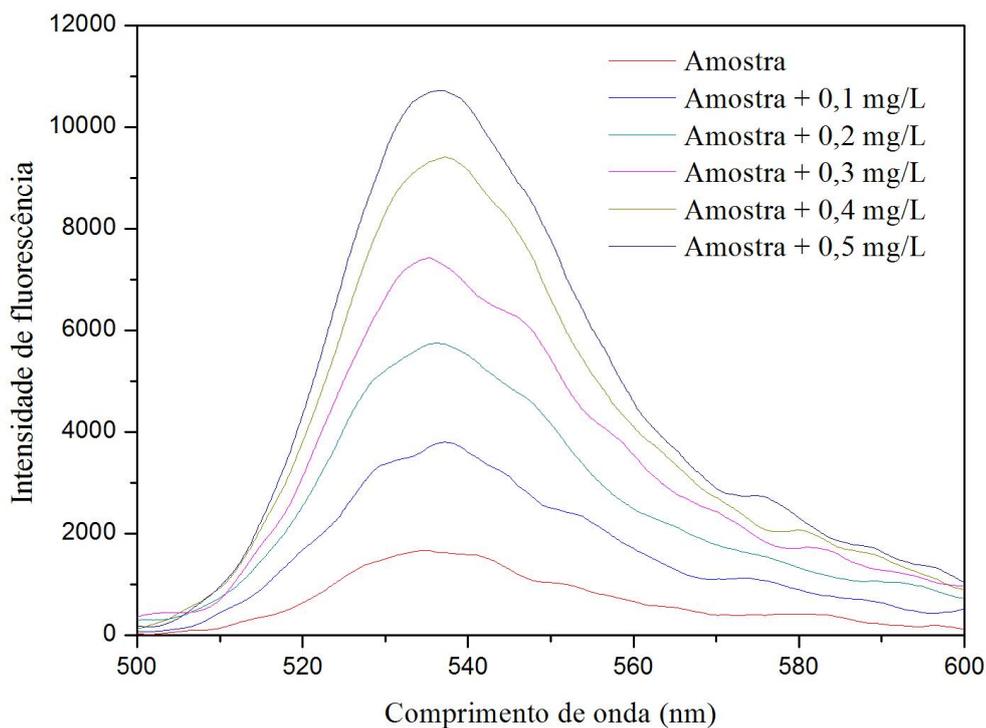
Observando a tabela 1 podemos verificar a relação entre o MEC e MAP para a análise de corante AM em água utilizando a espectroscopia absorção UV-Vis, os valores de concentração encontrados para o MEC e MAP foram respectivamente  $0,088 \pm 0,006$  e  $0,102 \pm 0,004$  mg/L, com desvio padrão relativo para o MEC e MAP no valores 6,8 e 3,8% respectivamente, indicando maior precisão para o MAP. Os valores de  $R^2$  para o MEC de 0,99909 foram levemente superiores ao do MAP de 0,9948 indicando melhor linearidade de curva de calibração, o ensaio de Recuperação (REC%) para o MEC foi de 88% contra 102% do MAP indicando melhor exatidão para MAP, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o MEC foram 0,002 e 0,01 mg/L respectivamente indicando maior sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,03 e 0,06 mg/L respectivamente.

Ainda analisando a tabela 1 podemos verificar os valores de concentração do AM em metanol utilizando a espectroscopia de absorção, os valores para o MEC e MAP são  $0,093 \pm 0,002$  e  $0,098 \pm 0,002$  mg/L respectivamente, com valores de desvio padrão relativo de 2,2 para o MEC e 2% para MAP, podemos considerar que os valores de concentração para MAP são mais exatos do que o MEC. Com relação aos valores de  $R^2$  o MEC e o MAP apresentaram os valores de 0,99923 e 0,99882 respectivamente, indicando leve superioridade na linearidade da curva de calibração para o MEC, a recuperação para o MEC de 93% e para o MAP de 98% indicam leve superioridade do MAP versus MEC para realizar medidas próximas do ideal de 100%, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o ambas a técnicas foram 0,004 e 0,01 mg/L

#### **12.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA EAM EM ÁGUA UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC.**

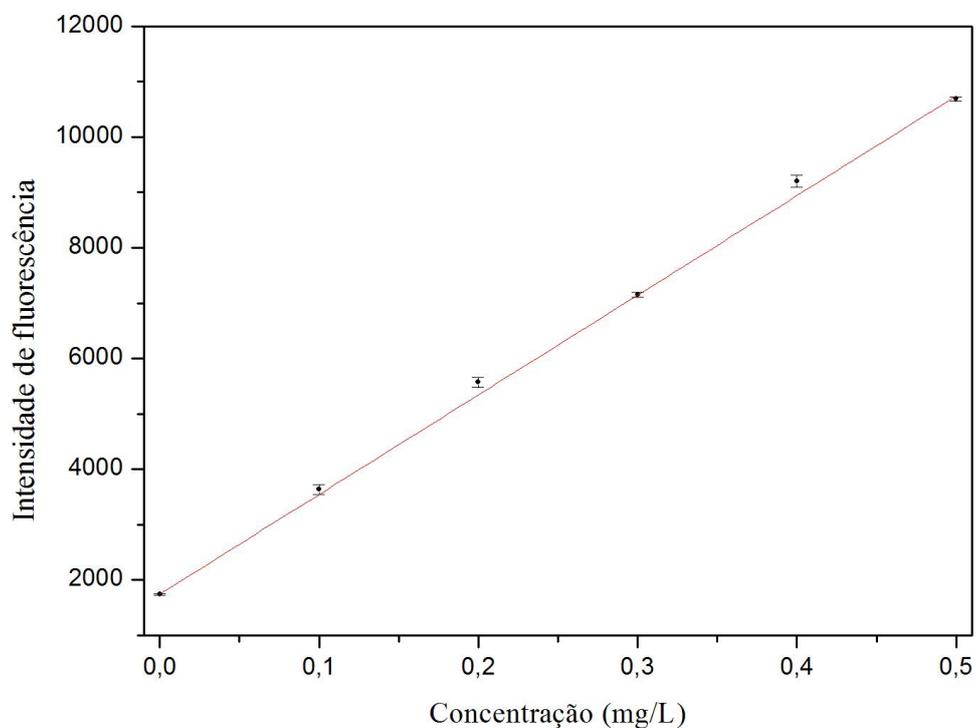
Primeiramente foi analisada a amostra contendo o corante eosina azul de metileno (EAM) diluído em água, através do método de adição de padrão (MAP) utilizando a espectroscopia de fluorescência e absorção na região do ultravioleta e visível.

Figura 31. Espectros de fluorescência da EAM em água, utilizado para análise do MAP,  $\lambda_{\text{excitação}} = 300 \text{ nm}$ .



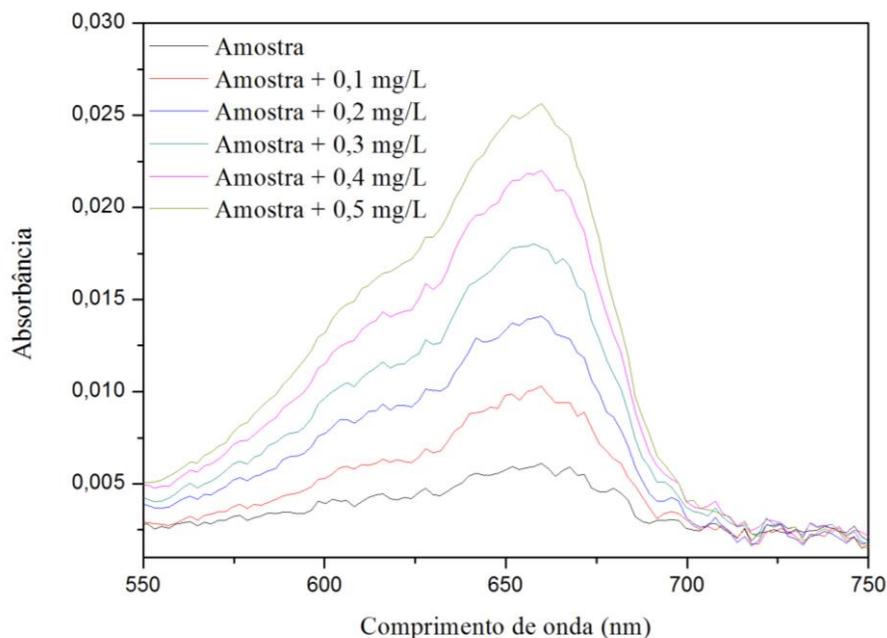
Através do conjunto de curvas espectrais gerados por fluorescência foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 536,2 nm, obteve-se o gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração (Figura 32) a fim de se calcular a concentração estimada de AM presente na amostra.

Figura 32. Intensidade de fluorescência em função da concentração de EAM em água para cada adição.



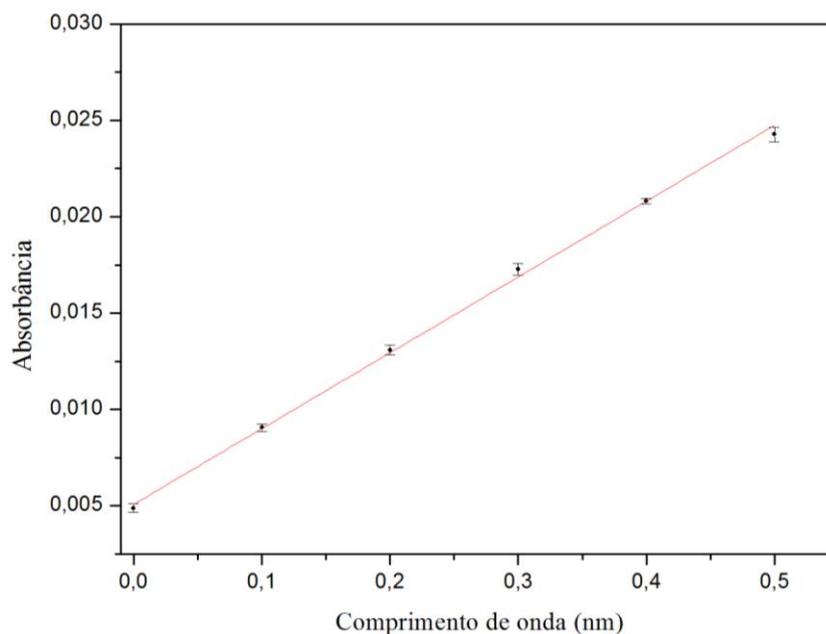
Através da equação da reta,  $y = 1744,23 + 18000,30491x$ , com  $R^2 = 0,99969$ , gerada pela regressão linear da figura 32 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,097 \pm 0,015$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um DPR% = 15 e uma Recp% = 97 do valor esperado e um LD e LQ de 0,007 e 0,02 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

Figura 33. Espectros de absorvância da EAM em água, utilizado na análise do MAP



Através do conjunto das curvas espectrais gerados pela absorvância foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 657,4 nm, obteve-se o gráfico da absorvância em função da concentração (Figuras 34) a fim de se calcular a concentração estimada de EAM presente na amostra.

Figura 34. Sinal de absorvância da EAM em água, utilizado na análise do MAP

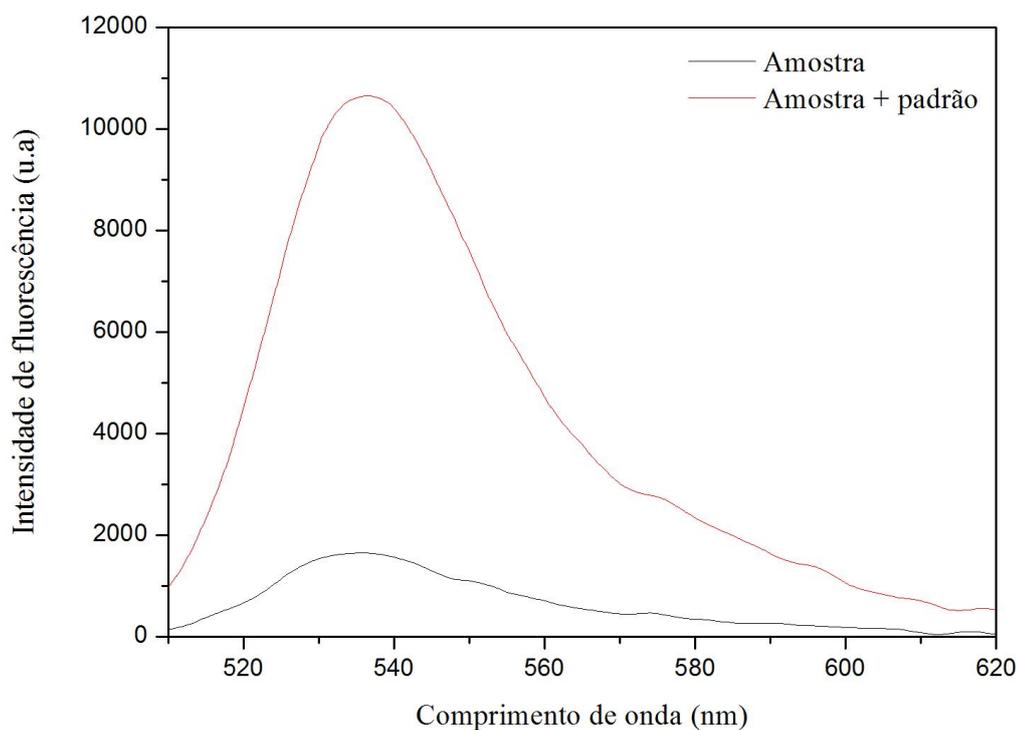


Através da equação da reta,  $y = 0,00507 + 0,03936x$ , com  $R^2 = 0,99894$ , gerada pela

regressão linear da figura 34 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,128 \pm 0,003$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 2,3$  e uma  $Recp\% = 128$  do valor esperado e um LD e LQ de  $0,006$  e  $0,01$  mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

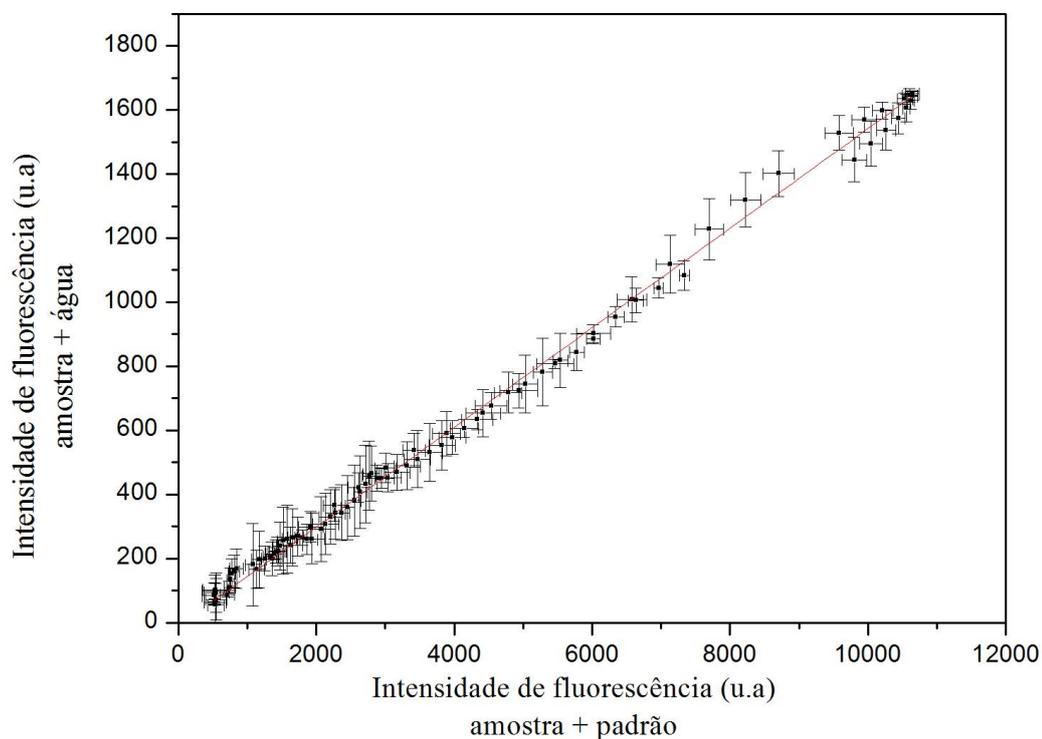
Para determinação da concentração da EAM em água utilizando a metodologia do MEC utilizou-se somente a solução contendo a amostra  $50\%vv^{-1}$  e padrão  $50\%vv^{-1}$  e a solução contendo a amostra  $50\%vv^{-1}$  e água  $50\%vv^{-1}$ .

Figura 35. Espectros de fluorescência da EAM em água,  $\lambda_{excitação} = 300$  nm, utilizado na análise do MEC.



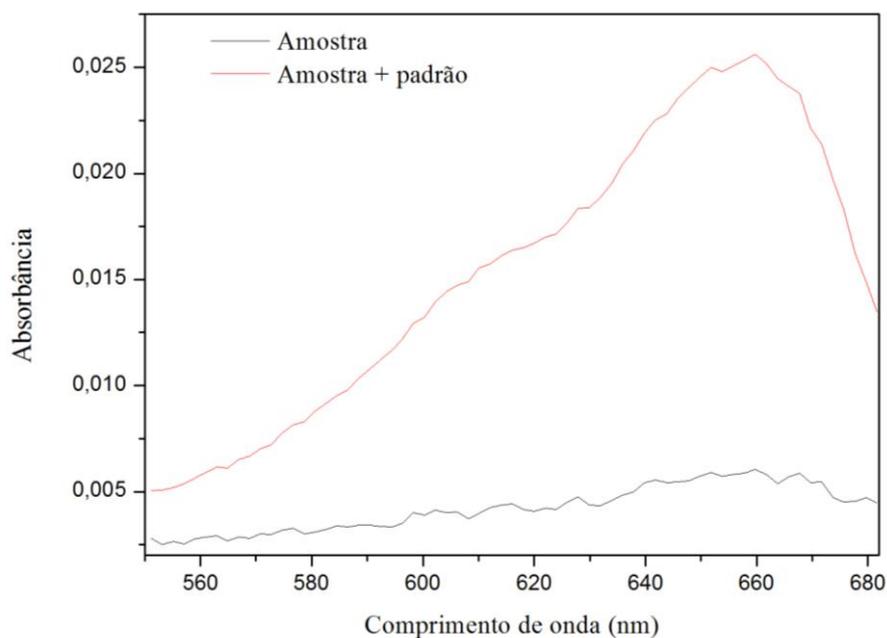
Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + água) versus solução (amostra + padrão) obtivemos a figura 36.

Figura 36. Intensidade de fluorescência da solução (amostra + água ) vs. solução (amostra + padrão).



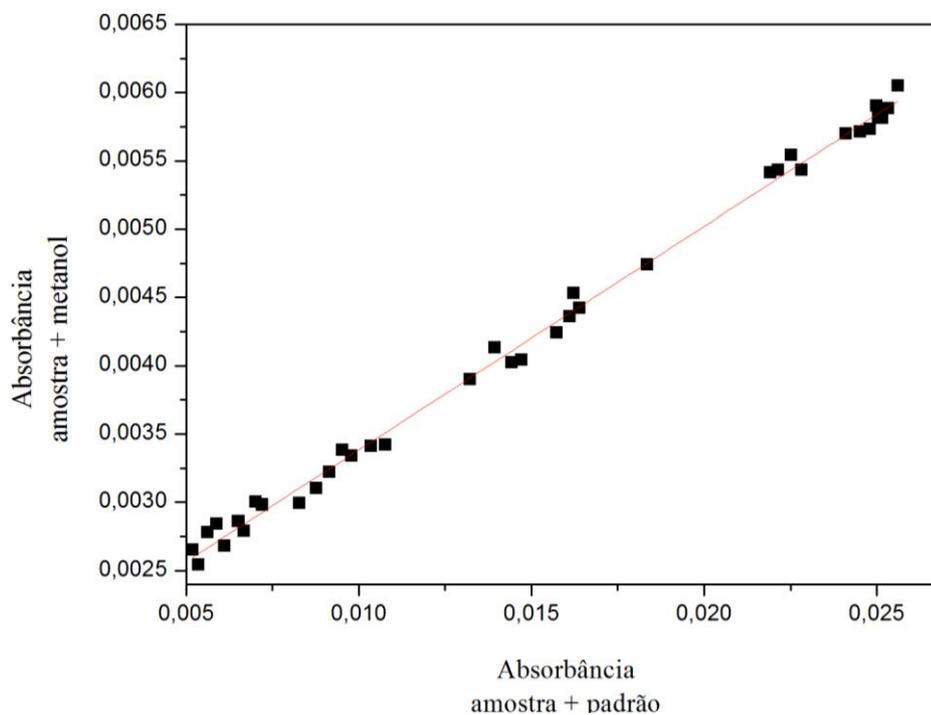
Através da equação da reta,  $y = -11,5137 + ,15531x$ , com  $R^2 = 0,99925$ , gerada pela regressão linear da figura 36 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,092 \pm 0,002$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 2,2$  e uma Recuperação = 92% do valor esperado e um LD e LQ de 0,004 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

Figura 37. Espectros de absorvância da EAM em água, utilizado na análise do MEC.



Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + metanol) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 38.

Figura 38. Sinal de absorvância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para a EAM em água.



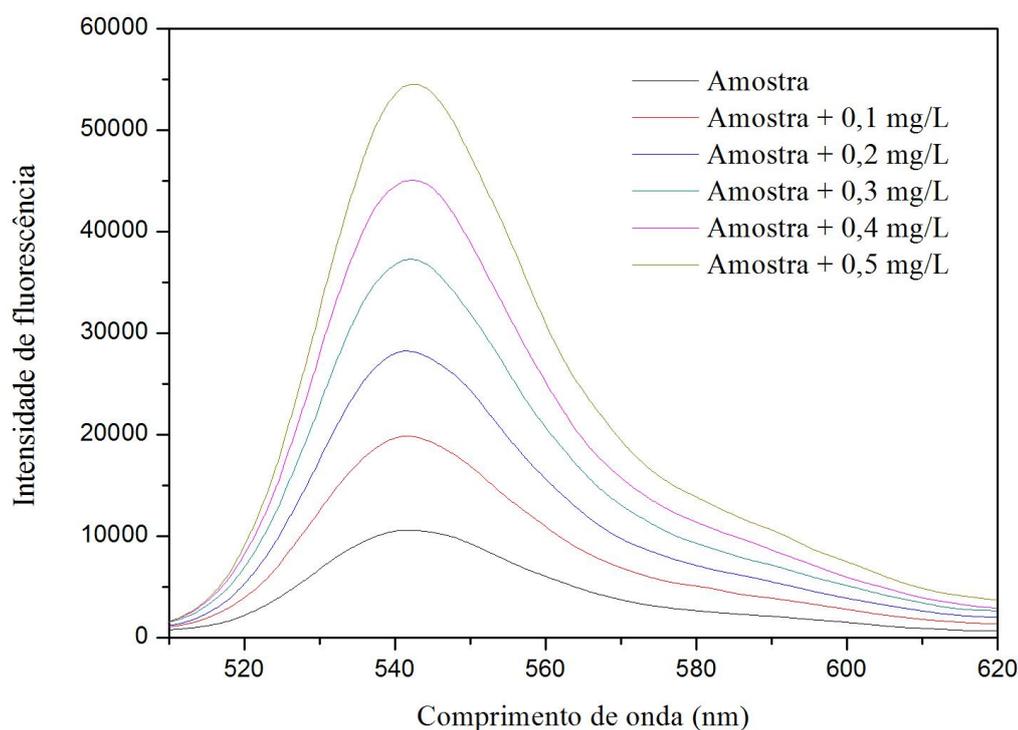
Através da equação da reta,  $y = 0,00175 + 0,16366x$ , com  $R^2 = 0,999597$ , gerada

pela regressão linear da figura 38 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,098 \pm 0,01$  mg/L de EAM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um DPR% = 10 e uma Recuperação = 98% do valor esperado e um LD e LQ de 0,004 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

## 12.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA EAM EM METANOL UTILIZANDO A TÉCNICA DO MAP E MEC

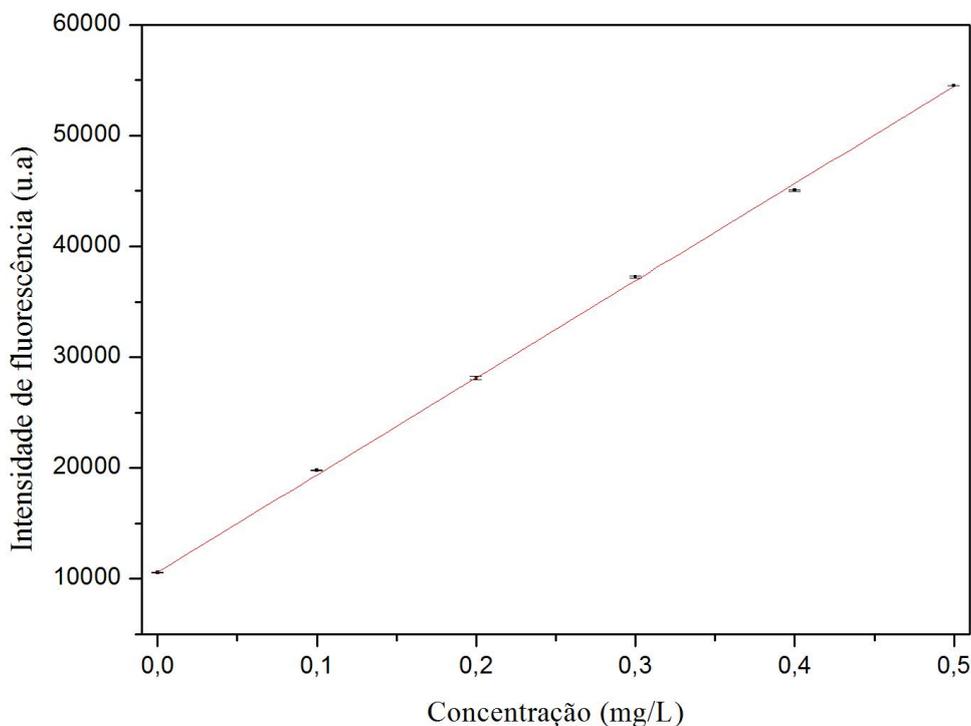
Determinamos concentração de EAM na amostra diluído em metanol primeiramente através do MAP utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência e absorção da região o ultravioleta e visível.

Figura 39. Espectros de fluorescência da EAM em metanol,  $\lambda_{excitação} = 300$  nm, utilizado na análise do MAP.



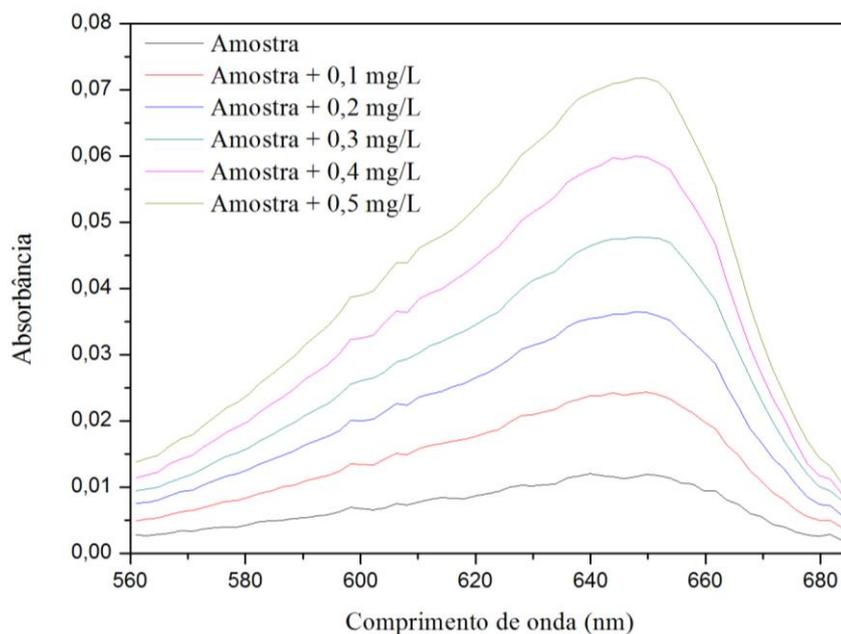
Através do conjunto de curvas espectrais gerados por fluorescência foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 542,7 nm, obteve-se o gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração (Figura 40) a fim de se calcular a concentração estimada de EAM presente na amostra.

Figura 40. Intensidade de fluorescência da EAM em metanol em função da concentração em cada adição.



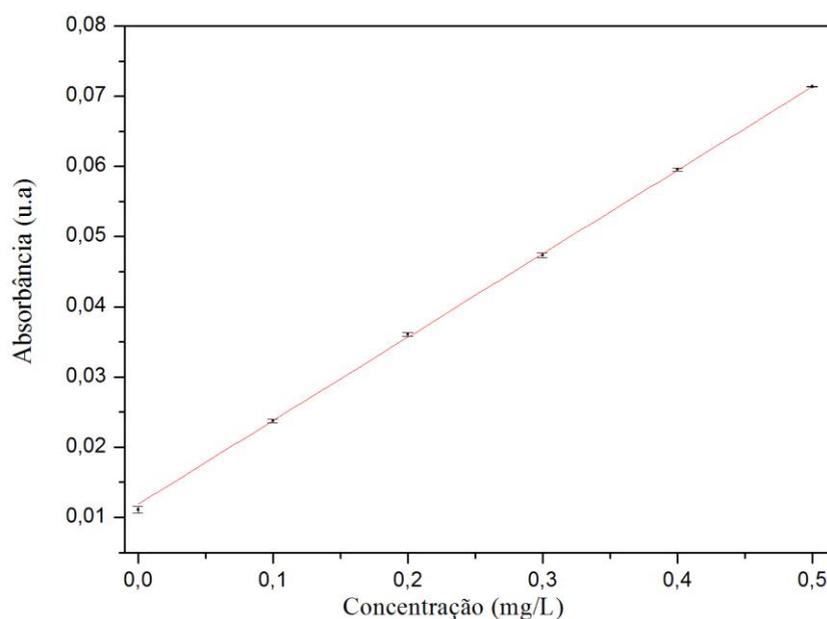
Através da equação da reta,  $y = 10605,18405 + 87678,2273x$  com  $R^2 = 0,99986$ , gerada pela regressão linear da figura 40 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração de  $0,120 \pm 0,0007$  mg/L de EAM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 0,58$  e uma  $Recp\% = 120$  do valor esperado e um LD e LQ de 0,02 e 0,05 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

Figura 41. Espectros de absorvância da EAM em metanol, utilizado na análise do MAP.



Através do conjunto das curvas espectrais gerados pela absorvância foram selecionadas as intensidades referentes ao comprimento de onda de 649,8 nm, obteve-se o gráfico da absorvância em função da concentração (Figuras 42) a fim de se calcular a concentração estimada de EAM presente na amostra.

Figura 42. Sinal de absorvância da EAM em metanol, utilizado na análise do MEC

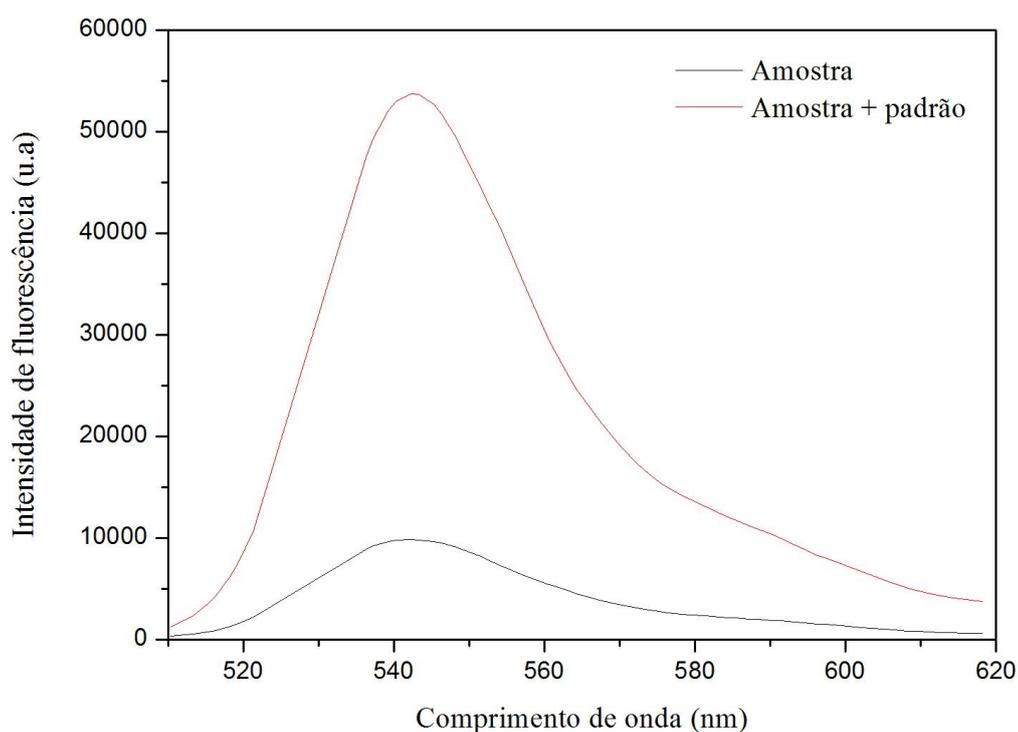


Através da equação da reta,  $y = 0,01191 + 0,11891x$ , com  $R^2 = 0,99988$ , gerada pela regressão linear da figura 42 e utilizando a equação 2 determinamos o valor da concentração

de  $0,100 \pm 0,013$  mg/L de EAM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 13$  e uma  $Recp\% = 100$  do valor esperado e um LD e LQ de 0,02 e 0,05 mg/L respectivamente, utilizando o método de adição de padrão.

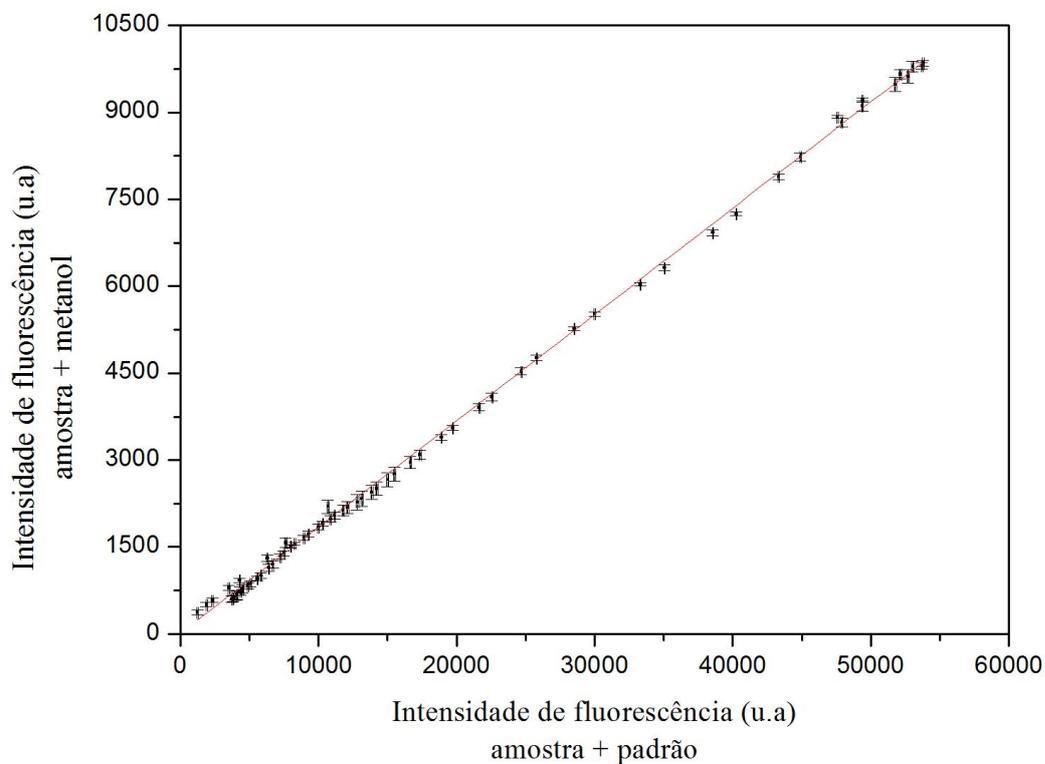
Para determinação da concentração da EAM em metanol utilizando a metodologia do MEC utilizou-se somente a solução contendo a amostra  $50\% \text{vv}^{-1}$  e padrão  $50\% \text{vv}^{-1}$  e a solução contendo a amostra  $50\% \text{vv}^{-1}$  e água  $50\% \text{vv}^{-1}$ .

Figura 43. Espectro de fluorescência da EAM em metanol,  $\lambda_{\text{excitação}} = 300$  nm, utilizado na análise do MEC.



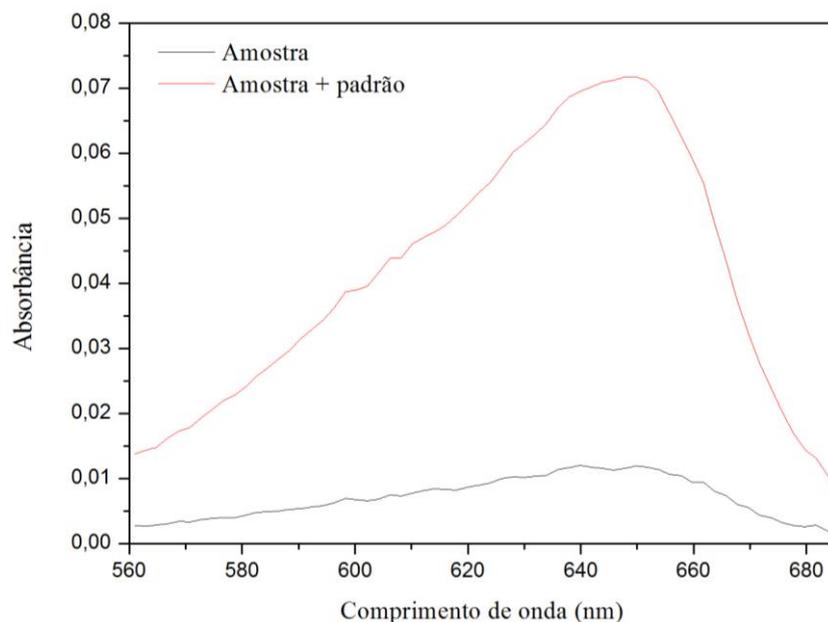
Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + metanol) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 44.

Figura 44. Intensidade de fluorescência da EAM em metanol para a solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão).



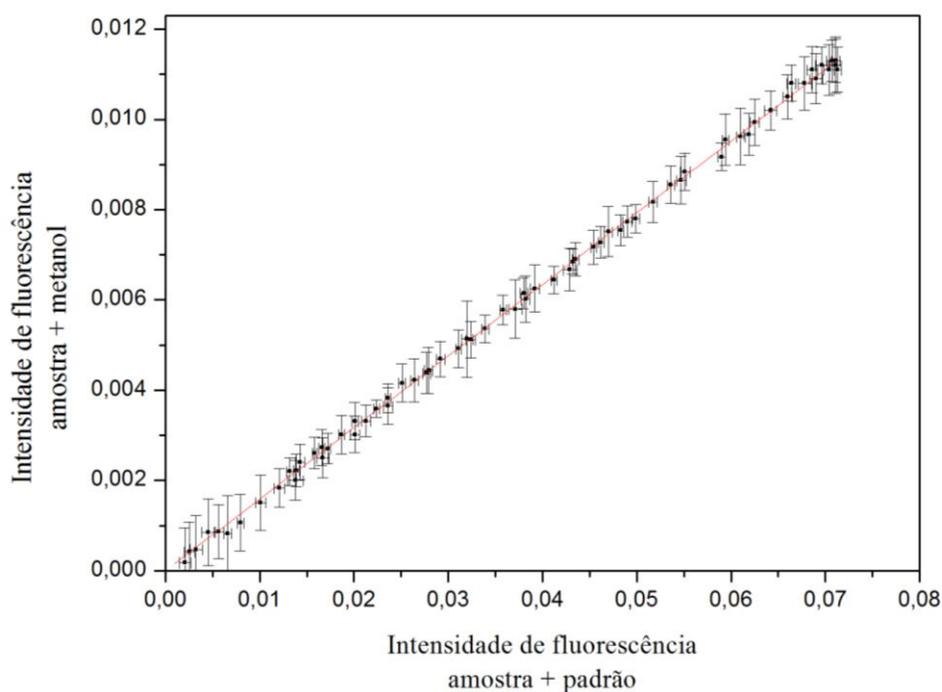
Através da equação da reta,  $y = 15,3394 + 0,18333x$ , com  $R^2 = 0,99907$ , gerada pela regressão linear da figura 44 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,112 \pm 0,0005$  mg/L de AM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um  $DPR\% = 0,45$  e uma Recuperação = 112% do valor esperado e um LD e LQ de 0,01 e 0,05 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

Figura 45. Espectro de absorbância da EAM em metanol, utilizado na análise do MEC.



Ao plotarmos as intensidades de fluorescências da solução (amostra + metanol) versus solução (amostra + padrão) obtemos a figura 46.

Figura 46. Sinal de absorbância da solução (amostra + metanol) vs. solução (amostra + padrão), para a EAM em metanol.



Através da equação da reta,  $y = 0,0000012 + 0,15864x$ , com  $R^2 = 0,99883$ , gerada

pela regressão linear da figura 46 e utilizando a equação 8 determinamos o valor da concentração de  $0,094 \pm 0,0009$  mg/L de EAM contido da amostra, esse valor de concentração apresentou um DPR% = 0,96 e uma Recuperação = 94% do valor esperado e um LD e LQ de 0,003 e 0,01 mg/L respectivamente, utilizando o método de calibração multi-energética.

## 12.6 RESUMO DOS RESULTADOS PARA EAM.

Tabela 2. Resumo dos resultados do corante EAM adquiridos por espectroscopia de fluorescência e absorção UV-Vis utilizando o MAP e o MEC.

Matriz	Fluorescência				Absorção			
	Água		Metanol		Água		Metanol	
Método	MAP	MEC	MAP	MEC	MAP	MEC	MAP	MEC
Concentração (mg/L)	0,097	0,092	0,120	0,112	0,128	0,098	0,100	0,094
R <sup>2</sup>	0,99969	0,99925	0,9986	0,99907	0,99894	0,999597	0,99988	0,99883
Desv. Padrão	0,015	0,002	0,0007	0,0005	0,003	0,01	0,013	0,0009
DPR%	15	2,2	0,58	0,45	2,3	10	13	0,96
Rec.%	97	92	120	112	128	98	100	94
LD (mg/L)	0,007	0,004	0,02	0,01	0,006	0,004	0,02	0,003
LQ (mg/L)	0,02	0,01	0,05	0,05	0,01	0,01	0,05	0,01

Através da tabela 2 podemos verificar a relação entre o MEC e MAP para a análise de corante EAM em água utilizando a espectroscopia de fluorescência, os valores de concentração encontrados para o MEC e MAP foram respectivamente  $0,092 \pm 0,002$  e  $0,097 \pm 0,015$  mg/L embora o valor da concentração pela técnica do MAP esteja aparentemente mais próximo do valor esperado de 0,1 mg/L o desvio padrão relativo de 15% mostrou-se menos preciso que o valor encontrado pelo MEC cujo desvio padrão relativo foi de somente 2,2%. Os valores de R<sup>2</sup> para o MEC de 0,99925 foram inferiores ao do MAP de 0,999696 representado uma leve inferioridade na linearidade de curva de calibração, o ensaio de recuperação (REC%) apresentou melhor resultado para o MAP 97% contra 92% do MEC, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o MEC foram 0,004 e 0,01 respectivamente indicando maior sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,007 e 0,02 respectivamente.

Ainda analisando a tabela 2 podemos verificar os valores de concentração do analito

encontrados na amostra da EAM em metanol utilizando a espectroscopia de fluorescência, os valores para o MEC e MAP são  $0,112 \pm 0,0005$  e  $0,120 \pm 0,0007$  mg/L respectivamente, o desvio padrão relativo (DPR%) para as ambas as técnicas ficaram em torno de 0,5%, dessa forma o valor de concentração encontrado pelo MEC ficou mais próximo do valor esperado de 0,1 mg/L. Os valores de  $R^2$  para o MEC e para o MAP foram 0,99907 e 0,9986 respectivamente, indicando praticamente a mesma linearidade da curva de calibração. A recuperação para o MEC de 112% indica medidas mais próxima do valor de ideal de recuperação de 100% quando comparado com valor de 120% medido para MAP, os limites de Detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o MEC foram 0,01 e 0,05 respectivamente indicando praticamente a mesma sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,02 e 0,05 respectivamente.

Através da tabela 2 podemos verificar a relação entre o MEC e MAP para a análise de corante EAM em água utilizando a espectroscopia absorção UV-Vis, os valores de concentração encontrados para o MEC e MAP foram respectivamente  $0,098 \pm 0,010$  e  $0,128 \pm 0,013$  mg/L, o DPR% para o MEC e para o MAP foi de 2,3 e 10% de mas o valores estão com praticamente a mesma exatidão considerando o desvio padrão de ambos. Os valores de  $R^2$  para o MEC de 0,999597 foram levemente superiores ao do MAP de 0,99894 indicando praticamente a mesma linearidade de curva de calibração, o ensaio de recuperação (REC%) para o MEC foi de 98% contra 128% do MAP indicando melhor resposta para MEC, os limites de detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) para o MEC foram 0,004 e 0,01 respectivamente indicando praticamente a mesma sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,006 e 0,01 respectivamente.

Para análise da EAM em metanol utilizado a espectroscopia de absorção, podemos verificar na tabela 2 os valores de concentração para o MEC e MAP de  $0,0940 \pm 0,0009$  e  $0,100 \pm 0,013$  mg/L respectivamente, com os desvios padrões relativos para o MEC a MAP de 0,96% contra 13% respectivamente, podemos afirmar que o valor encontrado para o MEC esta mais preciso do que o determinado pelo MAP. Com relação aos valores de  $R^2$  o MEC e o MAP apresentaram os valores de 0,99883 e 0,999597 respectivamente, indicando leve superioridade na linearidade da curva de calibração para o MAP, a recuperação para o MEC de 94% e para o MAP de 100% indica leve valores mais exatos para o MAP, em relação ao MEC os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o MEC foram 0,003 e 0,01 respectivamente indicando maior sensibilidade para medidas com baixos valores de concentração quando comparados com MAP de 0,02 e 0,05 respectivamente.

### 13 CONCLUSÃO

O MEC (MEC – do Inglês, Multi-Energy Calibration) mostrou ser uma alternativa simples e eficiente e com grande perspectiva de se tornar um método de calibração para análise de dados espectroscópicos obtidos pelas análises de absorção UV-Vis e de Fluorescência. O método mostrou-se robusto quando aplicado em matrizes diferentes (água e metanol) e apresentou resultados precisos usando apenas duas soluções de calibração, o que também contribui para um menor tempo de elaboração da curva de calibração e menor quantidade de analito em comparação com MAP (Método de Adição de Padrão) (o método MAP geralmente requer mais de duas soluções de calibração para melhor definir uma relação entre o analito concentração e resposta do instrumento). Neste trabalho o MEC apresentou resultados da determinação da concentração dos corantes *azul de metileno* e *eosina azul de metileno* comparados com o MAP, por diversas vezes foi verificado resultados com melhor precisão e curvas de calibração com melhor linearidade quando comparado com MAP.

Uma das dificuldades encontradas para a análise utilizando o MEC é a exigência de se determinar a concentração da solução padrão, uma incerteza significativa no valor desta concentração afeta de forma importante o valor final da concentração medida, em uma solução tradicional com um método de calibração utilizando apenas um valor de comprimento de onda, esse erro sistemático seria facilmente identificado como um ponto fora na curva no intervalo linear da curva de calibração. As interferências espectrais são mais facilmente detectadas com este método, como os pontos de calibração fora da curva são facilmente identificados, isto é uma vantagem exclusiva para o MEC, que não está disponível em métodos de calibração de um único comprimento de onda.

Uma limitação potencial do método MEC é que ele só pode ser analisado para analitos que apresentam múltiplas linhas espectrais. Também é importante notar que, similarmente ao MAP, interferências aditivas assim como sinais de fundo não serão corrigidos adequadamente no MEC.

Como mostrado no presente estudo, o MEC não requer modificações ou estratégias especiais para aplicação em técnicas como fluorescência molecular e absorção UV-Vis, e mostrou-se confiável para determinação de curvas de calibração para os corantes utilizados nesse trabalho.

### 14 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] United States Pharmacopeial Convention, USP chapter <857> ultraviolet-visible spectroscopy, USP/NF 39 (2016).
- [2] United States Pharmacopeial Convention, USP chapter <853> fluorescence spectroscopy, USP/NF 39 (2016).
- [3] NISTIR 7458 Standard Guide to Fluorescence - Instrument Calibration and Validation, USA, 2007.
- [4] Miller, J.C.; Miller, J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*. 1st ed. Ellis Horwood Lt., Chichester, USA, 1984.
- [5] Danzer K., Currie L. A. Guideline for calibration in analytical chemistry: Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure & Appl. Chem.*, 1998, 70(4), 993-1014.
- [6] Vogiatzis C., Zachariadis G. An evaluation of the use of yttrium and beryllium as internal standards in inductively coupled plasma emission spectrometry for untreated aqueous solutions in presence of high concentrations of organic solvents and matrices. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 2030-2038.
- [7] Veening H. Quantitative infrared analysis of xylene mixtures: Internal standard method *J. Chem. Educ.* 1966, 43, 319-320.
- [8] Bader M. A. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.*, 1980, 57, 703-706.
- [9] Bro R. Multivariate calibration: What is in chemometrics for the analytical chemist? *Anal. Chim. Acta*, 2003, 500(1-2), 185-194.
- [10] Fortunato F. M., Bechlin M. A., Gomes Neto J. A.; Donati G. L., Jones B. T. Standard dilution analysis in flow system: Sodium determinations by flame atomic emission spectrometry. *Microchem. J.* 2015, 122, 63-69.
- [11] Chetty A. A., Prasad S. Flow injection analysis of nitrate and nitrite in commercial baby

foods. *Food Chem., Part A*, 2016, 197 503-508.

[12] Goncalves D. A., McSweeney T., Santos, M. C., Donati, G. L. Multi-Energy Calibration: Fast Matrix-Matching Determinations in Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry, In: 2016 *Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, 2016, Tucson, AZ, USA. Final Program and Extended Abstracts 2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, v. 2016. p.184-186.

[13] Virgilio A., Gonçalves, D. G., McSweeney T., Neto, J. A. G., Nóbrega, J. A., Donati, J. L. Multi-Energy Calibration Applied to Atomic Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2017, 982 31-36.

[14] PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova*, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

[15] International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms, 3rd edition (VIM 3) available as ISO/IEC Guide 99-12:2007, p. 28.

[16] Brito, N. M.; Juniro, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003

[17] Pimental, M. F.; Neto, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. Departamento de química fundamental. UFPE. 1995.

[18] Skoog, West, Holler e Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edição, 2016.

[19] Fernandes C. Avaliação do método de adição de padrão aliado a uma câmara fototérmica para a quantificação de água em etanol. Dissertação (Dissertação em química) – UFMS. Campo Grande, p. 37. 2016.

[20] Becherrawy T. *Electromagnetism: Maxwell Equations, Wave Propagation and Emission*, Ed. Wiley, USA, 2016.

[21] Harman, P. M. *The natural philosophy of James Clerk Maxwell*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press. p. 6, 1998.

- [22] PULAY, P. “Ab Initio Calculation of Force Constants and Equilibrium Geometries in Polyatomic Molecules. I. Theory”, *Molecular Physics*, v.17, n. 2, pp. 197-204, 1969.
- [23] YAMAGUCHI, Y., FRISCH, M. J., GAW, J., et al. “Analytic Evaluation and Basis Set Dependence of Intensities of Infrared Spectra”, *Journal of Chemical Physics*, v. 84, n. 4, pp. 2262-2278, Feb. 1986.
- [24] FRISCH, M. J., YAMAGUCHI, Y., GAW, J. F., et al. “Analytic Raman Intensities from Molecular Electronic Wave Functions”. *Journal of Chemical Physics*, v. 84, n. 1, pp. 531-532, Jan. 1985.
- [25] Pavia, D.L; Lampman, G. M; Kriz, G. R; Vyvyan J. R. *Introdução à espectroscopia*. 4ª edição,
- [26] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ª Edição. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, EUA 2006.
- [27] Komarova, N.I., Rogachev, A.D., Chernyak, E.I. et al. *Chem Nat Compd*, 2009.
- [28] Perkampus, H. H.; *UV-VIS spectroscopy and its applications*, Springer-Verlag: Berlin, 1992.
- [29] Granick MS.; Heckler FR.; Jones EW. *Surgical skin-marking techniques*. *Plast Reconstr Surg* 1987; 79: 573-80.
- [30] Fogler R.; Golembe E. *Methylene blue injection. An intraoperative guide in small bowel resection for arteriovenous malformation*. *Arch Surg* 1978; 113: 194-5.
- [31] Longo J. P. F.; Azevedo R. B. *Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas*. *Rev. Clín. Pesq. Odontol.*, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 249-257, set./dez. 2010.
- [32] Nevien A. S.; Manal M. S.; Maha F. A.; Ahmed M. S. *Effect of methylene blue-mediated photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma*. *Lasers Med Sci*. 2014.

- [33] BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.82, p. 1-8, 2015.
- BLACK, J. G. Microbiologia fundamentos e perspectivas, Rio de Janeiro, 4 ed. Guanabara Koogan, 2013.
- [34] CAIRES, C. S. A. Avaliação da inativação fotodinâmica em *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* utilizando os fotossensibilizadores eosina azul de metileno e metalo-clorofilina. Dissertação (Dissertação em Saúde e desenvolvimento da região centro oeste) – UFMS. Campo Grande, p. 36. 2017
- [35] MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Prentice Hall/Pearson, 2010
- [36] Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W.A. et al. Pharm Res (2000) 17: 1551.
- [37] González, A.G., Herrador. M.A., Asuero A.G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. Talanta, 1999.
- [38] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE no 899 de 29/05/2003.