



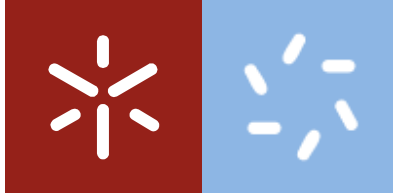
**Determinação das quantidades mínimas de IR3535 e estudo da disponibilidade recorrendo à técnica de Espectroscopia de UV-VIS**

Ana Catarina Dias Afonso

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências







**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Ana Catarina Dias Afonso

**Determinação das quantidades mínimas  
de IR3535 e estudo da disponibilidade  
recorrendo à técnica de Espectroscopia  
de UV-VIS**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e  
Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Engenheiro Mário Alberto Oliveira Corticeiro  
Alves de Brito**  
e da  
**Professora Doutora Maria Gabriela  
Coutinho Soares Lema Botelho**

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Ana Catarina Dias Afonso

**Endereço Eletrónico:** ana\_afonso\_26\_6@hotmail.com

**Título da Tese de Mestrado:** Determinação das quantidades mínimas de IR3535 e estudo da disponibilidade recorrendo à técnica de Espectroscopia UV-VIS

**Orientador:** Engenheiro Mário Alberto Oliveira Corticeiro Alves de Brito e Professora Doutora Maria Gabriela Coutinho Soares Lema Botelho

**Ano de conclusão:** 2021

**Designação do mestrado:** Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Com a finalização desta dissertação não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram nesta caminhada tão importante na minha vida.

À empresa Smart Inovation®, Lda. e aos seus colaboradores por me receberem e tornarem a experiência bastante agradável. A todos deixo um agradecimento especial por me ajudarem a descontrair nos momentos de maior aperto, tensão e pela força que me transmitiram ao longo de todos os dias.

Ao meu orientador Engenheiro Mário Brito, da Smart Inovation®, Lda., por me ter aceite para a realização deste estágio, proporcionando-me uma experiência única, e também pela sua disponibilidade, ajuda e confiança.

À Universidade do Minho, e ao Centro/Departamento de Química pela oportunidade de realizar este trabalho e pela disponibilidade de equipamentos e materiais

À minha orientadora, a Professora Doutora Gabriela Botelho, da Universidade do Minho, por ter aceite orientar-me neste projeto e pela sua incondicional dedicação, disponibilidade, apoio e boa disposição.

Às Professoras Doutoradas, Susana Costa e Ana Paula Bettencourt, por estarem sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas.

À minha colega de departamento, Madalena Freitas, que me ajudou grande parte do tempo, e esteve sempre lá, pronta a dizer-me algumas das suas sábias palavras, que a tanto caracterizam.

Aos meus pais e irmão, por toda a paciência, compreensão, preocupação, encorajamento e motivação que sempre me transmitiram para ultrapassar cada etapa.

Ao meu namorado, Jorge, por todo o apoio que me foi dando ao longo desta etapa. Tenho a agradecer toda a paciência, compreensão e força que me foi demonstrando. Sempre demonstrou um apoio incondicional em todos os momentos deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer às minhas amigas pelo carinho e pela amizade imprescindível com que me têm brindado ao longo de vários anos estando sempre presentes para um momento de descontração.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## RESUMO

As doenças transmitidas por mosquitos são das mais mortais, e por isso, os mosquitos são uma ameaça para milhões de pessoas. A tecnologia associada a repelentes representa um papel fundamental no controlo efetivo e sustentável dos mosquitos. Um dos propósitos da Smart Inovation®, Lda. é contribuir para esse controlo e para isso desenvolveu uma gama de produtos com propriedades de repelência, a gama Si Repel Mosquito®, que pode ser aplicada em vários substratos, sendo o principal substrato, o têxtil.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a quantificação da substância ativa éster etílico do ácido 3-(N-butil-N-acetil)aminopropionico (IR3535), presente em amostras têxteis tratadas com o Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish), produzido pela Smart Inovation®, Lda. Este método é importante para a empresa, pois permite validar a presença do IR3535 em amostras têxteis, antes destas seguirem para testes de eficácia de forma a garantir que o resultado do mesmo seja positivo.

Numa etapa inicial realizaram-se extrações em amostras têxteis com diferentes solventes: o Acetonitrilo, o Etanol e o Isopropanol. Após as extrações, foi necessário quantificar o composto IR3535 (substância ativa) extraído pelo solvente recorrendo à técnica de Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS).

Posteriormente, calculou-se o rendimento de extração para cada solvente, com o objetivo de perceber qual era o mais eficiente. Obteve-se um rendimento de 69, 28 e 0% na extração com Acetonitrilo, Etanol e Isopropanol, respetivamente. De seguida, procedeu-se à validação do método apresentado neste trabalho, com o solvente Acetonitrilo, através do estudo de alguns parâmetros como a Calibração da reta, Gama de trabalho, Linearidade, Limiares Analíticos (Deteção e Quantificação), Sensibilidade, Precisão e Exatidão, estudos estes que foram realizados seguindo uma bibliografia específica, permitindo assim estabelecer critérios de aceitação para o método. Pela análise do coeficiente de correlação da curva de calibração para os padrões de IR3535 constatou-se que existe uma boa correlação entre as absorvâncias e as concentrações dos padrões, tendo-se verificado um coeficiente de correlação de 0,998. O limite de deteção foi de  $5,34 \times 10^{-6}$  mol/L e o limite de quantificação foi de  $1,62 \times 10^{-5}$  mol/L.

**Palavras-chave:** IR3535, Repelentes, UV-VIS, Validação do método

## ABSTRACT

Mosquito-borne diseases are some of the deadliest diseases in the world. As such, mosquitoes are a threat to millions of people. The technology associated with repellents plays a fundamental role in the effective and sustainable control of mosquitoes. One of Smart Inovation®, Lda.'s purposes is to contribute to the prevention of this issue. With this in mind, the company has developed a wide range of products with repellence properties, the Si Repel Mosquito®, which can be applied to various substrates - the main substrate being textiles.

This work aims to develop and validate an analytical method for the quantification of the active substance ethyl 3-[acetyl(butyl)amino]propanoate (IR3535), present in textiles treated with Si Repel Mosquito® 101- TF (Textile Finish), produced by Smart Inovation®, Lda. This method is very important, since it allows the company to validate the presence of IR3535 in its textiles before making effectiveness tests, ensuring a positive result.

In an initial stage, textile extractions were carried out with different solvents: Acetonitrile, Ethanol and Isopropanol. After the extraction, it was necessary to quantify the IR3535 (active substance) extracted by the solvent. For this matter, the ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) technique was used.

Subsequently, the extraction yield of each solvent was calculated, in order to understand which was the most efficient. A yield of 69, 28 and 0% was obtained in the extraction with Acetonitrile, Ethanol and Isopropanol, respectively. Then, the validation of the method presented in this work was carried out using the solvent Acetonitrile. For this purposed, parameters such as Calibration, Working range, Linearity, Limit of detection and limit of quantification, Analytical sensitivity, Precision and Accuracy were analysed. These studies were carried out following a specific bibliography, thus allowing the establishment of acceptance criteria for the method. By analysing the correlation coefficient of the calibration curve for the IR3535 standards, it was concluded that there is a good correlation between the absorbances and concentrations of the standards, with a correlation coefficient of 0,998. The detection limit was  $5,34 \times 10^{-6}$  mol/L and the quantification limit was  $1,62 \times 10^{-5}$  mol/L.

**Keywords:** IR3535, Repellents, UV-VIS, Method validation



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução.....	14
<b>1.1. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA</b> .....	15
<b>1.2. MOTIVAÇÃO</b> .....	15
<b>1.3. OBJETIVOS DO TRABALHO</b> .....	16
<b>CAPÍTULO 2</b> Estado da Arte.....	18
<b>2.1 ACABAMENTOS FUNCIONAIS</b> .....	19
<b>2.1.1 ACABAMENTOS QUÍMICOS</b> .....	19
<b>2.1.2 NANOTECNOLOGIA NOS ACABAMENTOS FUNCIONAIS</b> .....	20
<b>2.2 REPELENTES</b> .....	21
<b>2.2.1 IR3535</b> .....	23
<b>2.3 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO</b> .....	25
<b>2.3.1 ESPETROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)</b> .....	25
<b>2.3.2 LEI DE LAMBERT-BEER</b> .....	26
<b>2.4 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO</b> .....	28
<b>2.4.1 CALIBRAÇÃO</b> .....	29
<b>2.4.2 GAMA DE TRABALHO</b> .....	31
<b>2.4.3 LINEARIDADE</b> .....	33
<b>2.4.4 LIMIARES ANALÍTICOS</b> .....	34
<b>2.4.4.1 LIMITE DE DETEÇÃO – LDD</b> .....	34
<b>2.4.4.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO – LDQ</b> .....	34
<b>2.4.5 SENSIBILIDADE</b> .....	35
<b>2.4.6 PRECISÃO</b> .....	35
<b>2.4.6.1 REPETIBILIDADE</b> .....	35
<b>2.4.6.3 PRECISÃO INTERMÉDIA</b> .....	36
<b>2.4.7 EXATIDÃO</b> .....	36
<b>CAPÍTULO 3</b> Parte Experimental .....	39

<b>3.1 AMOSTRAGEM</b> .....	40
<b>3.2 REAGENTES</b> .....	40
<b>3.3 CONDIÇÕES DE ANÁLISE UV-VIS</b> .....	41
<b>3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS TÊXTEIS</b> .....	41
<b>3.5 ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS</b> .....	42
<b>3.6 QUANTIFICAÇÃO</b> .....	43
<b>3.7 RENDIMENTO</b> .....	43
<b>3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b> .....	44
<b>3.8.1 GAMA DE TRABALHO</b> .....	44
<b>3.8.2 LINEARIDADE</b> .....	44
<b>3.8.3 LIMIARES ANALÍTICOS</b> .....	44
<b>3.8.4 PRECISÃO</b> .....	44
<b>3.8.5 EXATIDÃO</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 4</b> Apresentação e discussão dos resultados .....	45
<b>4.1 ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS, QUANTIFICAÇÃO E RENDIMENTO</b> .....	46
<b>4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b> .....	56
<b>a) IR3535</b> .....	56
<b>4.2.1 CALIBRAÇÃO</b> .....	56
<b>4.2.2 GAMA DE TRABALHO</b> .....	58
<b>4.2.3 LINEARIDADE</b> .....	58
<b>4.2.4 LIMIARES ANALÍTICOS</b> .....	60
<b>4.2.5 SENSIBILIDADE</b> .....	60
<b>4.2.6 PRECISÃO</b> .....	60
<b>4.2.7 EXATIDÃO</b> .....	62
<b>b) COMPOSTO C</b> .....	64
<b>4.2.8 CALIBRAÇÃO</b> .....	64
<b>4.2.9 LINEARIDADE</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 5</b> Conclusão.....	67
<b>5.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	70
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	71
<b>ANEXOS</b> .....	76
<b>ANEXO 1 – VALORES DE T DE STUDENT, PARA 95% DE PROBABILIDADE<sup>51</sup></b> .....	77
<b>ANEXO 2 – VALORES DE DISTRIBUIÇÃO F DE SNEDECOR, PARA 95% DE PROBABILIDADE<sup>51</sup></b> .....	78
<b>ANEXO 3 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DO IR3535 NAS AMOSTRAS APÓS A EXTRAÇÃO</b> .....	79

<b>ANEXO 4 – CÁLCULOS INTERMÉDIOS USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....</b>	<b>80</b>
---	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Logotipo da empresa.....	15
<b>Figura 2.</b> Modo de ação dos repelentes. Os mosquitos são atraídos pelos odores corporais (nuvem verde). Os repelentes (nuvem vermelha) vão perturbar essa atração. Imagem adaptada de 18. ....	21
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas do DEET, da Icaridina e da Permetrina. Imagem adaptada de 22. ....	23
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do IR3535. Imagem adaptada de 25.....	23
<b>Figura 5.</b> Espectro eletromagnético. Imagem adaptada de 36. ....	25
<b>Figura 6.</b> Processo de excitação. Imagem adaptada de 37. ....	26
<b>Figura 7.</b> Amostra de tecido cortada em quadrados com 0,5 cm de aresta.....	41
<b>Figura 8.</b> Amostra de tecido em agitação com o solvente. ....	41
<b>Figura 9.</b> Banho ultrassônico. ....	42
<b>Figura 10.</b> Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Acetonitrilo.....	46
<b>Figura 11.</b> Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Etanol. ....	46
<b>Figura 12.</b> Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Isopropanol.....	47
<b>Figura 13.</b> Curva de calibração do composto IR3535 no comprimento de onda de 200 nm no solvente Acetonitrilo.....	48
<b>Figura 14.</b> Curva de calibração do composto IR3535 no comprimento de onda de 203 nm no solvente Acetonitrilo.....	49
<b>Figura 15.</b> Curva de calibração do composto C no comprimento de onda de 200 nm no solvente Acetonitrilo.....	49
<b>Figura 16.</b> Curva de calibração do composto C no comprimento de onda de 203 nm no solvente Acetonitrilo.....	49
<b>Figura 17.</b> Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 209 nm no solvente Etanol....	50
<b>Figura 18.</b> Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 212 nm no solvente Etanol....	50
<b>Figura 19.</b> Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 209 nm no solvente Etanol.....	50
<b>Figura 20.</b> Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 212 nm no solvente Etanol.....	51
<b>Figura 21.</b> Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 213 nm no solvente Isopropanol.....	51
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 214 nm no solvente Isopropanol.....	51
<b>Figura 23.</b> Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 213 nm no solvente Isopropanol.....	52
<b>Figura 24.</b> Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 214 nm no solvente Isopropanol.....	52
<b>Figura 25.</b> Curva de calibração referente às soluções padrão com o IR3535. ....	57
<b>Figura 26.</b> Regressão linear do método.....	59
<b>Figura 27.</b> Regressão polinomial do método. ....	59
<b>Figura 28.</b> Curva de calibração do Composto C. ....	64
<b>Figura 29.</b> Regressão linear do método.....	65
<b>Figura 30.</b> Regressão polinomial do método. ....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características ideais dos repelentes de insetos. <sup>21</sup> .....	22
<b>Tabela 2.</b> Concentração do analito e respetivas taxas de recuperação. <sup>37</sup> .....	37
<b>Tabela 3.</b> Massa dos compostos por grama de tecido, após a aplicação do produto.....	40
<b>Tabela 4.</b> Lista de características dos reagentes utilizados nas extracções e na preparação de soluções padrão.....	40
<b>Tabela 5.</b> Concentrações usadas na preparação das soluções nos diferentes solventes. ....	43
<b>Tabela 6.</b> Concentrações teóricas do IR3535 e do Composto C nas amostras após a extração.....	43
<b>Tabela 7.</b> Comprimentos de onda máximos para ambos os compostos. ....	48
<b>Tabela 8.</b> Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Acetonitrilo.....	53
<b>Tabela 9.</b> Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Etanol.....	53
<b>Tabela 10.</b> Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Isopropanol.....	53
<b>Tabela 11.</b> Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Acetonitrilo nos diferentes comprimentos de onda máximos.....	53
<b>Tabela 12.</b> Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Etanol nos diferentes comprimentos de onda máximos.....	54
<b>Tabela 13.</b> Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Isopropanol nos diferentes comprimentos de onda máximos.....	54
<b>Tabela 14.</b> Concentrações experimentais do IR3535 e rendimentos de cada extração com os diferentes solventes. ....	56
<b>Tabela 15.</b> Valores de absorvância medidos para cada solução padrão. ....	56
<b>Tabela 16.</b> Valores obtidos para o desvio padrão e coeficiente de variação do método.....	57
<b>Tabela 17.</b> Valores obtidos no estudo da gama de trabalho. ....	58
<b>Tabela 18.</b> Valores obtidos no teste da homogeneidade das variâncias.....	58
<b>Tabela 19.</b> Valores obtidos para o estudo da linearidade. ....	59
<b>Tabela 20.</b> Valores obtidos no cálculo dos limiares analíticos. ....	60
<b>Tabela 21.</b> Valores de absorvância obtidos na análise das 10 réplicas independentes do padrão 1 e 5. ....	61
<b>Tabela 22.</b> Dados obtidos no estudo da repetibilidade.....	61
<b>Tabela 23.</b> Dados obtidos no estudo da precisão intermédia. ....	62
<b>Tabela 24.</b> Valores obtidos no estudo da exatidão, os ensaios de recuperação.....	63
<b>Tabela 25.</b> Valores obtidos para o Teste t. ....	63
<b>Tabela 26.</b> Valores de absorvância medidos para cada solução padrão. ....	64
<b>Tabela 27.</b> Valores obtidos para o desvio padrão e coeficiente de variação do método.....	65
<b>Tabela 28.</b> Valores obtidos para o estudo da linearidade. ....	66
<b>Tabela 29.</b> Cálculo do desvio padrão residual, $S_y/x$ . ....	80
<b>Tabela 30.</b> Cálculo da incerteza associado ao declive da reta, $S_b.t$ .....	80
<b>Tabela 31.</b> Cálculo da incerteza associado à ordenada de origem da reta, $S_a.t$ .....	81
<b>Tabela 32.</b> Cálculo da incerteza associada à concentração do analito na amostra, $S_x0$ .....	81
<b>Tabela 33.</b> Cálculo do desvio padrão do método, $S_m$ . ....	81
<b>Tabela 34.</b> Cálculo de coeficiente de variação do método, $CV_m$ . ....	81
<b>Tabela 35.</b> Cálculo do desvio padrão da gama de trabalho.....	82
<b>Tabela 36.</b> Cálculo da diferença entre variâncias, $DS$ , e o valor de $PG$ . ....	82

<b>Tabela 37.</b> Cálculo do desvio padrão residual, $S_{y/x}$ .....	83
<b>Tabela 38.</b> Cálculo da incerteza associado ao declive da reta, $S_{b.t.}$ .....	83
<b>Tabela 39.</b> Cálculo da incerteza associado à ordenada de origem da reta, $S_{a.t.}$ .....	83
<b>Tabela 40.</b> Cálculo do desvio padrão do método, $S_m$ .....	84
<b>Tabela 41.</b> Cálculo de coeficiente de variação do método, $CV_m$ .....	84
<b>Tabela 42.</b> Cálculo da diferença entre variâncias, $DS$ , e o valor de $PG$ .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>CAS</b>	Serviço de resumos químicos (do inglês <i>Chemical Abstracts Service</i> )
<b>DAD</b>	Detetor de Matriz de Díodos (do inglês <i>Diodo-Array Detection</i> )
<b>DEET</b>	N, N-dietil-3-metilbenzamida
<b>EIL</b>	Ensaio Interlaboratorial
<b>EPA</b>	Agência de Proteção Ambiental (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IR3535</b>	Éster etílico do ácido 3-(N-butil-N-acetil)aminopropionico
<b>LDD</b>	Limite de Detecção
<b>LDQ</b>	Limite de Quantificação
<b>MRC</b>	Material de Referência Certificado
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta-Visível

# **CAPÍTULO 1**

Introdução



## 1.1. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA

A Smart Inovation®, Lda. foi fundada em 2010 e está integrada num grupo empresarial multidisciplinar detentor de um vasto conhecimento na indústria das novas tecnologias que empregam princípios ativos inovadores. Na figura 1 é apresentado o logótipo atual da empresa.



**Figura 1.** Logotipo da empresa.

A Smart Inovation®, Lda. é uma empresa de nanotecnologia que desenvolve soluções químicas com aplicabilidade em diferentes produtos e sectores. Através da sua tecnologia consegue conferir novas características e funções aos diferentes materiais. Composta por uma equipa multidisciplinar, que trabalha para desafiar as regras e paradigmas estabelecidos, a empresa ajuda parceiros de diferentes indústrias a adicionarem valor à sua oferta e a abrirem novas categorias de mercado.

A tecnologia Si desenvolvida pela Smart Inovation®, Lda. é inovadora, única e está patenteada em 147 países. Consiste numa matriz de nanopartículas que permite transportar princípios ativos.

As nanopartículas podem ligar-se a diversos materiais, tais como, têxteis, tintas, vernizes, papéis ou cerâmica, atribuindo-lhes novas propriedades e características diferenciadoras.

É uma tecnologia segura, sustentável, amiga do ambiente e confere uma alta eficácia e longa durabilidade dos princípios ativos nos diferentes materiais. Por ter uma aplicação simples, a Tecnologia Si é aplicável em diferentes setores e equipamentos.

## 1.2. MOTIVAÇÃO

Os mosquitos representam uma ameaça para milhões de pessoas em todo o mundo, uma vez que atuam como vetores patógenos e parasitas devastadores.<sup>1</sup> As doenças transmitidas por vetores são das mais mortais, todos os anos mais de um bilhão de pessoas são infetadas e mais de um milhão de pessoas morrem de doenças transmitidas por vetores, incluindo malária, dengue, esquistossomose, leishmaniose, doença de Chagas, febre-amarela, filariose linfática e oncocercose.<sup>2</sup>

As doenças causadas por picadas de mosquitos aumentaram devido á adaptação dos mesmos para ambientes urbanos. As mudanças climáticas estão a expandir as áreas quentes e húmidas do planeta, que associadas a ambientes urbanos fornecem as condições perfeitas para a multiplicação dos mosquitos e o aparecimento de doenças virais transmitidas por vetores.<sup>3</sup>

O controlo efetivo e sustentável dos vetores é um desafio intrigante para a saúde pública em todo o mundo, com referência especial às comunidades locais nos países em desenvolvimento, que têm um acesso precário a diagnósticos, prevenção e tratamento adequados de doenças infecciosas.<sup>4</sup>

Embora as estratégias de controlo de vetores baseadas em inseticidas sejam para a prevenção das doenças, a resistências a inseticidas e outros obstáculos podem diminuir a eficácia dessa abordagem. As tecnologias de repelentes representam uma alternativa fundamental na prevenção da transmissão de doenças transmitidas por vetores.<sup>5</sup>

Atualmente estão a ser implementados esforços a nível internacional para controlar a propagação de doenças, identificar novos repelentes e educar as pessoas para diminuir o risco de infeção.<sup>6</sup>

A Smart Inovation®, Lda. tem vindo a revelar-se como um parceiro importante que pretende combater e prevenir determinadas doenças que se revelam verdadeiros flagelos mundiais com os seus produtos inovadores. Uma das principais gamas de produtos produzidas pela Smart é a gama Si Repel Mosquito®, que pode ser aplicada em várias áreas como a indústria têxtil, indústria das tintas, área da cosmética e saúde, entre outras. Apesar das várias aplicações, o principal foco da empresa tem vindo a ser a indústria têxtil, e para isso a Smart dispõe de um acabamento funcional têxtil, Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish), que ao ser aplicado nas diversas fibras têxteis vai conferir-lhes uma propriedade de repelência. Este acabamento é eficaz e resistente a mais de 100 lavagens, na luta contra mosquitos, carraças, moscas, piolhos e outros insetos. Ideal para prevenir picadas e transmissão de doenças infecciosas. O Si Repel Mosquito® oferece uma proteção de longa duração e valor acrescentado aos têxteis.

### **1.3. OBJETIVOS DO TRABALHO**

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a quantificação do IR3535 presente em amostras têxteis tratadas com o Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish).

A implementação deste método de quantificação tem como principal objetivo validar e quantificar a presença de IR3535 em amostras têxteis resultantes de ensaios de aplicação do produto o Si Repel Mosquito® 101-TF realizados pela própria empresa e pelos clientes, antes das mesmas seguirem para testes de eficácia, de forma a garantir um resultado positivo.

Para isso procedeu-se á extração da substância ativa das amostras têxteis e de seguida quantificou-se a mesma através da Espetroscopia de UV-VIS. Por último, realizou-se a validação de alguns dos parâmetros do método analítico para a quantificação de substância ativa.

# **CAPÍTULO 2**

Estado da Arte

## **2.1 ACABAMENTOS FUNCIONAIS**

Ao longo dos anos vem-se observando um grande desenvolvimento na indústria têxtil, nomeadamente na criação de artigos têxteis diferenciados através da sua funcionalização, respondendo assim às exigências dos consumidores e criadores da moda.<sup>7</sup> Com estes desenvolvimentos para além da função tradicional de vestir pessoas, a têxtil passou a proporcionar conforto, proteção e funcionalidades aos artigos.<sup>8</sup>

A funcionalização dos têxteis pode ser definida como um processo que atribui determinadas características ao material, que podem ser obtidas através:

- Da própria fibra, isto é, a mesma já ter esse tipo de características ou através de aditivos adicionados ao processo da fiação da fibra;
- Fios, tecidos ou malhas, por exemplo, com fibras ou camadas diferentes;
- Acabamento têxtil.<sup>9</sup>

Os acabamentos funcionais permitem que os artigos têxteis, após a sua funcionalização, adquiram a capacidade de interagir e reagir aos estímulos externos do usuário e do meio-ambiente, como por exemplo, passam a ser capazes de responder aos estímulos elétricos, químicos e magnéticos, e esta resposta será dada pela funcionalidade integrada na sua estrutura.<sup>10</sup>

Na indústria têxtil, a aplicação do acabamento funcional normalmente é realizada na fase final do processamento têxtil. De uma forma geral, os acabamentos podem ser classificados nas seguintes classes, e podem ser utilizados individualmente ou combinados entre si: acabamentos mecânicos, químicos e biotecnológicos.<sup>11</sup>

Neste trabalho apenas vamos estudar os acabamentos químicos pois o Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish) da Smart Inovation®, Lda., pertence a esta classe.

### **2.1.1 ACABAMENTOS QUÍMICOS**

Os acabamentos químicos baseiam-se na aplicação de produtos químicos que reagem com as fibras ou cuja simples presença no tecido altera as suas propriedades.<sup>8</sup> A funcionalização dos têxteis com acabamentos químicos permite manipular as propriedades da superfície dos têxteis sem comprometer o seu conforto e as suas propriedades mecânicas.<sup>12</sup>

Os acabamentos químicos podem ser aplicados através dos meios tradicionais, tais como, a impregnação, a exaustão, a impressão, o revestimento, entre outros. No entanto nos últimos

anos têm vindo a ser desenvolvidos outros meios de aplicação alternativos aos tradicionais, que é o caso do encapsulamento, através das microcápsulas, da nanotecnologia através de nanopartículas de diversos materiais, entre outros.<sup>9</sup>

Com a evolução da nanotecnologia, uma nova área desenvolveu-se no domínio dos acabamentos têxteis. A nanotecnologia abriu novos caminhos nos acabamentos químicos, que resultou no desenvolvimento de processos aprimorados, que contribuem para alcançar novas propriedades funcionais que não eram possíveis com acabamentos químicos tradicionais.<sup>11</sup>

Como já foi referido anteriormente, no Capítulo “1.1 Apresentação da empresa”, a Smart Innovation, Lda. recorre ao uso de nanotecnologia nos diversos acabamentos têxteis que dispõe.

## **2.1.2 NANOTECNOLOGIA NOS ACABAMENTOS FUNCIONAIS**

A nanotecnologia tem vindo a crescer em muitas áreas, como é o exemplo da mecânica, eletrônica, ótica, medicina, plásticos, eletrônica e aeroespacial. Atualmente, desempenha um papel extraordinário no acabamento funcional de têxteis e polímeros.<sup>13</sup>

A nanotecnologia é a ciência que controla e manipula matéria com dimensões nano, entre os 1 e 10 nm, podendo ser aplicada em diferentes áreas da ciência.<sup>12</sup>

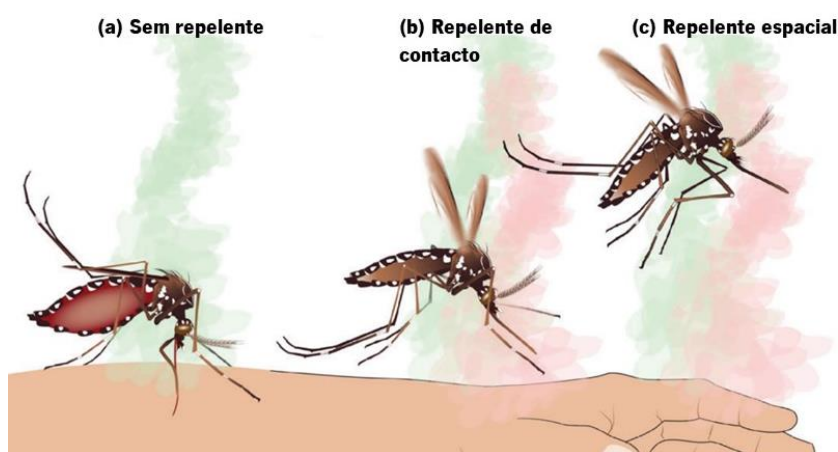
Um dos desenvolvimentos mais promissores desta tecnologia é a produção de nanopartículas. Comparando com partículas de maiores dimensões, as nanopartículas possuem características únicas, como por exemplo, as excelentes propriedades químicas, magnéticas, óticas e mecânicas.<sup>14</sup>

A aplicação de nanopartículas confere novas características aos têxteis, como por exemplo, retardante de chama, proteção a radiação UV, repelência à água, autolimpeza, propriedades antimicrobianas e repelente de insetos.<sup>13</sup>

## 2.2 REPELENTE

As doenças causadas pelas picadas dos mosquitos, como o dengue, a febre-amarela e a doença Zika, têm vindo a aumentar, resultado de três fatores do mundo moderno: a urbanização, a modernização e a mobilidade internacional.<sup>3</sup> Os repelentes de mosquitos podem ser uma escolha simples e eficaz para reduzir ou até eliminar o risco de contrair doenças.<sup>15</sup> Devido a isto, a aplicação de repelentes de insetos, nas suas diversas formas, tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos como método de prevenção dessas mesmas doenças pelo mundo todo.<sup>16</sup>

Os repelentes de mosquitos são substâncias químicas e têm um único objetivo, afastar os mosquitos do ser humano.<sup>17</sup> O modo de ação dos repelentes pode ser dividido em dois tipos: nos que afetam o sentido do olfato do mosquito, os repelentes espaciais, e naqueles que afetam o sentido do tato, os repelentes de contacto, como se pode observar na figura 2. Os repelentes espaciais afastam os mosquitos sem permitir que estes toquem no ser humano. Isto acontece porque quando os mosquitos entram em contacto com as moléculas do repelente, estas vão bloquear os sensores de olfato do mosquito impossibilitando assim de detetar o seu alvo (os mosquitos são atraídos pelos odores do corpo humano). Nos repelentes de contacto o mecanismo difere um pouco, pois estes permitem que o mosquito pouse na pele, mas que o mesmo seja afastado antes de a ferrar. Quando os mosquitos entram em contacto com a pele tratada de repelente, as moléculas vão atuar no sistema nervoso do mosquito provocando-lhe um estado de confusão que o leva imediatamente a fugir da zona com repelente.<sup>11</sup>



**Figura 2.** Modo de ação dos repelentes. Os mosquitos são atraídos pelos odores corporais (nuvem verde). Os repelentes (nuvem vermelha) vão perturbar essa atração. Imagem adaptada de 18.

Os repelentes podem ser comercializados de diversas formas – cremes, sprays, óleos, pulseiras – mas também podem ser vendidos como acabamentos têxteis ou aditivos para lavanderia.<sup>19,20</sup> Os têxteis com propriedades de repelência contra os mosquitos têm tido um potencial significativo no mercado. Não apenas nas áreas tropicais onde as doenças infecciosas transmitidas pelos mosquitos são mais comuns, mas também na áreas urbanas por todo o mundo.<sup>11</sup>

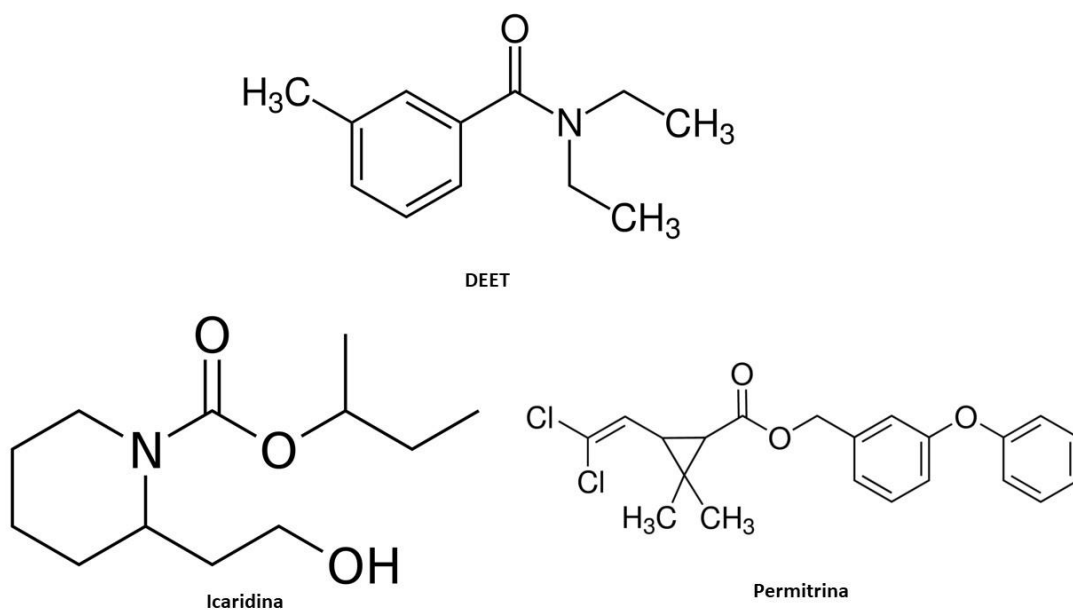
A eficiência de um repelente depende imenso das características da sua formulação. Um repelente ideal tem como principais características a eficácia prolongada contra várias espécies de insetos, não causar irritações na pele a quando do uso e não ser tóxico.<sup>20,21</sup> Na tabela 1 são apresentadas as características ideais que um repelente deve ter.

**Tabela 1.** Características ideais dos repelentes de insetos.<sup>21</sup>

- 
- 1.** Eficácia contra um grande número de espécies de insetos
  - 2.** Não irritar a pele na sua aplicação
  - 3.** Não ter odor ou ter um odor agradável
  - 4.** Não afetar a roupa depois da aplicação (manchar, branquear, enfraquecer as fibras)
  - 5.** Não deixar resíduos na pele
  - 6.** Quimicamente estáveis
  - 7.** Viável economicamente
  - 8.** Não tóxico
  - 9.** Efeito prolongado (8 a 12h)
- 

Os repelentes podem ser divididos em dois tipos – os naturais e os sintéticos. Os repelentes naturais derivam de produtos extraídos de plantas, como por exemplo, os óleos essenciais. O óleo de citronela, o óleo de eucalipto e o óleo de Neem são alguns óleos essenciais com propriedades de repelência. Já os repelentes sintéticos são produzidos em grande escala por indústrias químicas. Os repelentes sintéticos mais comuns são o DEET, o IR3535, a Icaridina e a Permetrina, cujas estruturas químicas são apresentadas nas figura 3 e 4.<sup>3,22</sup>



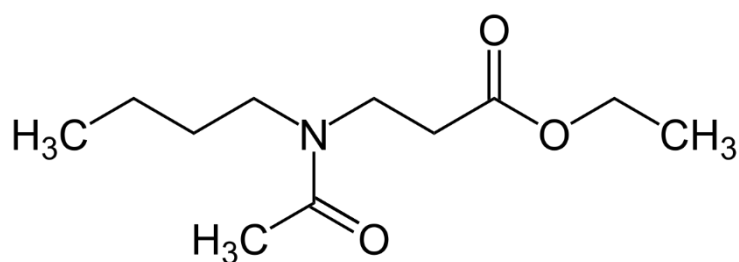


**Figura 3.** Estruturas químicas do DEET, da Icaridina e da Permetrina.  
Imagem adaptada de 22.

Neste trabalho apenas vai ser abordado o repelente IR3535. A Smart Inovation®, Lda. opta por usar este repelente na sua gama de produtos Si Repel Mosquito®, pois o IR3535 quando comparado com os outros repelentes mais comuns apresenta a vantagem de ser menos tóxico e mais sustentável para a mesma gama de concentração de aplicação.

### 2.2.1 IR3535

O IR3535, com o nome químico de éster etílico do ácido 3-(N-butil-N-acetil)aminopropionico, figura 4, é uma molécula sintética derivada da  $\beta$ -alanina, um aminoácido natural.<sup>23,24</sup>



**Figura 4.** Estrutura química do IR3535.  
Imagem adaptada de 25.

Foi desenvolvido pela Merck por volta dos anos 70, e está disponível no mercado europeu há mais de três décadas. Nos Estados Unidos apenas foi introduzido no mercado no ano de 1999, após ser

aprovado pela Environmental Protection Agency (EPA), classificando o mesmo como um repelente de insetos e um biopesticida.<sup>26,27</sup>

O IR3535 é um líquido sem cor e sem odor. À temperatura ambiente este apresenta uma pressão de vapor baixa, sendo assim uma substância volátil. Tem uma baixa solubilidade em água, mas dissolve-se bem em solventes orgânicos.<sup>25</sup>

O IR3535 tem eficácia contra mosquitos, moscas, carrapatos, piolhos, vespas e abelhas.<sup>3</sup> Normalmente é aplicado com concentrações entre os 6 e 20%, e independentemente da forma de aplicação, este apresenta uma eficácia prolongada de pelo menos 8h contra qualquer inseto referido a cima.<sup>25,28</sup> Em comparação com outros repelentes do mercado, o IR3535 tem uma menor toxicidade, o que permite ser usado em produtos repelentes recomendados para grávidas e para crianças a partir dos seis meses de idade.<sup>25</sup>

O mecanismo de ação do IR3535 deve-se ao facto de ser uma substância volátil, e assim formar barreiras de vapor nas zonas de aplicação, que têm um efeito repelente no inseto. Por ser um repelente e não um inseticida (produto químico que mata insetos), estes últimos não conseguem desenvolver resistência a esta substância ativa.<sup>3,25</sup>

## 2.3 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

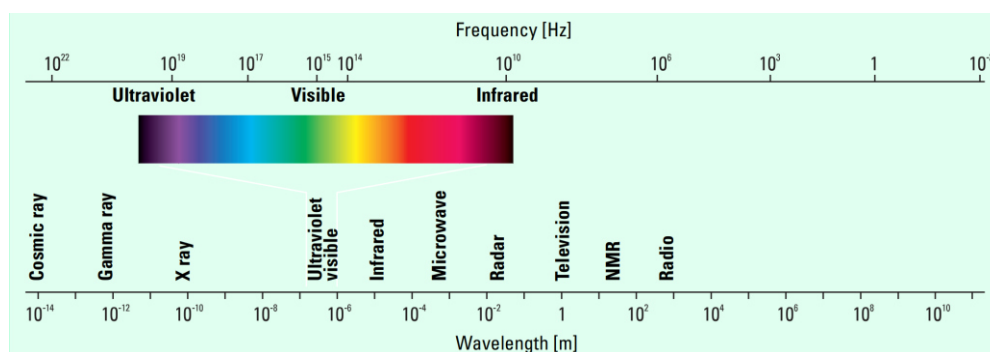
Numa primeira abordagem deste trabalho, após uma pesquisa, verificou-se que o método de quantificação de repelentes mais usual é a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado sempre a um instrumento de detecção, como por exemplo, HPLC acoplado a um detetor UV<sup>29,30</sup> e HPLC acoplado a um detetor de matriz de díodos (DAD)<sup>31</sup>.

O trabalho foi iniciado usando a técnica HPLC, no entanto devido a problemas técnicos não foi possível acabar o trabalho usando este método. Posto isto foi necessário realizar uma nova pesquisa para ver um outro método usado na quantificação de repelentes, onde se concluiu que o trabalho poderia ser realizado usando a Espectroscopia UV-VIS.<sup>32,33</sup>

### 2.3.1 ESPETROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

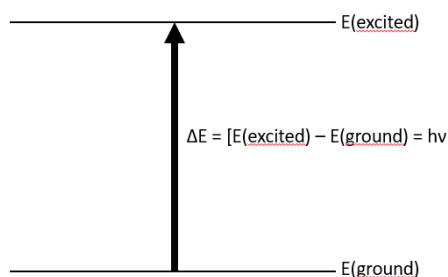
A espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS) é usada na quantificação de um grande numero de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas.<sup>34</sup>

A radiação ultravioleta e visível apenas compreende uma pequena parte do espectro eletromagnético, como se pode observar na figura 5. Considera-se que a radiação ultravioleta corresponde à gama de comprimento de onda entre os 100 e os 400 nm, e que a radiação visível corresponde à gama de comprimento de onda entre os 400 e 800 nm.<sup>35,36</sup>



**Figura 5.** Espectro eletromagnético.  
Imagem adaptada de 36.

A espectroscopia UV-VIS tem como base as transições eletrônicas que ocorrem nas diferentes espécies quando estas absorvem radiação. A absorção de radiação tem como consequência a excitação de elétrons, de um nível de baixa energia (estado fundamental) para um nível de maior energia (estado excitado), figura 6. Este processo só ocorre quando a energia absorvida pelo elétron é igual ou superior à energia que separa os dois estados, por este motivo diz-se que o processo de excitação é quantizado.<sup>37</sup>



**Figura 6.** Processo de excitação.  
Imagem adaptada de 37.

Os conjuntos de átomos responsáveis pela absorção da radiação são chamados de cromóforos, estes podem ser grupos funcionais insaturados ou aromáticos.<sup>37</sup> No caso da substância ativa em estudo, o IR3535, como se pode observar na figura 3, este apresenta dois grupos cromóforos, os dois grupos carbonílicos. São estes dois grupos presentes na molécula responsáveis pela absorção da radiação e assim permitir que a quantificação do mesmo nas diferentes amostras seja feita através da espectroscopia UV-VIS. O composto IR3535 absorve num comprimento de onda entre os 200 nm e os 300 nm.<sup>38</sup>

### 2.3.2 LEI DE LAMBERT-BEER

Quando a radiação incide na amostra, a quantidade de radiação absorvida é a diferença entre a radiação incidente,  $I_0$ , e a radiação transmitida,  $I$ , que pode ser expressa através da transmitância,  $T$ , ou da absorvância,  $A$ .<sup>36</sup>

A transmitância é definida como uma fração da radiação incidente na amostra, Equação 1.<sup>39</sup>

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $I$  é a intensidade da radiação transmitida e  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente.

Para um meio totalmente absorvente a transmitância é nula,  $I=0$ , enquanto que para um meio completamente transparente é unitária ( $I=I_0$ ). Embora a transmitância seja uma grandeza intuitiva, é usual ser substituída pela absorvância.<sup>35</sup>

$$A = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) = -\log T \quad \text{Equação 2}$$

A absorvância tem um papel importante, pois esta é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, esta é a base da Lei de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Equação 3

Onde,  $\epsilon$  é a constante da absorvibilidade molar,  $c$  é a concentração da amostra e  $b$  é o percurso ótico que usualmente é igual a 1 cm, e assim obtemos a equação na sua forma simplificada.<sup>39</sup>

$$A = \epsilon \times c$$

Equação 4

O princípio da Lei de Lambert-Beer, que diz que a absorvância é proporcional à concentração, também se aplica a soluções com mais do que uma espécie absorvente. Neste caso a absorvância da solução vai ser o somatório das absorvâncias de cada espécies presentes na solução, equação 5.<sup>36</sup>

$$A_{(x+y)} = A_x + A_y = (\epsilon_x \times b \times c_x) + (\epsilon_y \times b \times c_y)$$

Equação 5

## 2.4 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método já conhecido por um laboratório, carece de um processo de avaliação que verifica a sua eficiência. Esse processo é denominado de validação.<sup>40</sup>

A validação de um método é um requisito muito importante na química analítica, porque um método é um processo que envolve várias ações suscetíveis à ocorrência de erros, sistemáticos e/ou aleatórios, e por consequente, em algumas situações alterar significativamente o valor do resultado final. É também fundamental que o laboratório disponha de meios e critérios objetivos, para demonstrar, através da validação, que os métodos que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.<sup>41,42</sup>

Quando se pretende validar um método o primeiro passo a realizar é a sua descrição e caracterização. A descrição dos métodos deve ser feita em documentos, de forma detalhada e organizada, de modo que, qualquer pessoa com a devida preparação o consiga pôr em prática. Estes documentos deverão conter:

- **Elementos de identificação do documento**
  - Título ou designação do ensaio;
  - Código identificador do ensaio;
  - Revisão/edição;
  - Data de entrada em vigor e responsáveis pela sua elaboração e aprovação;
  - Número de cada página e número total de páginas.
- **Elementos descritos do método**
  - Resumo ou referência aos princípios teóricos da determinação indicando as grandezas influentes no resultado;
  - Campo de aplicação;
  - Equipamento, material e reagentes;
  - Processo de calibração;
  - Procedimento de ensaio;
  - Processo de cálculo dos resultados.
- **Elementos bibliográficos e normativos**<sup>42,43</sup>

Sempre que um laboratório instaura um método analítico interno, este terá de realizar um processo de validação do método. A validação de um método consiste no estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes:

- Gama de trabalho;
- Linearidade;
- Limiares analíticos (Deteção e Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.

Existem vários requisitos mínimos para a validação, no entanto, o laboratório deve seleccioná-los mediante o tipo de método. Por exemplo, nas análises qualitativas, não é necessário estudar o limite de quantificação, a precisão, a exatidão, a gama de trabalho e a linearidade. Neste tipo de análises, o limite de deteção, a seletividade e a robustez são os requisitos mínimos para a validação. No caso das análises quantitativas, que é o caso do método desenvolvido neste trabalho, os parâmetros acima mencionados são importantes.<sup>42,44</sup>

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta.<sup>42</sup>

### **2.4.1 CALIBRAÇÃO**

A calibração de um método mostra que a resposta de um processo está relacionada com a concentração do analito. O processo da calibração é constituído pelos seguintes passos:

- 1.** Preparar uma série de soluções padrão em que a concentração do analito é conhecida;
- 2.** Medir as soluções padrão num equipamento analítico, nas mesmas condições experimentais;
- 3.** Representar os resultados num gráfico de calibração.
- 4.** Determinar a concentração das amostras a analisar por interpolação na reta do gráfico.

Durante o processo de calibração devemos ter em atenção alguns aspetos importantes. As soluções padrão devem estar distribuídas equitativamente pela gama de trabalho, e por vezes

a resposta obtida do branco é diferente de zero, então, este deve ser incluído na curva de calibração.

A curva de calibração é dada pela equação 6, que representa o sinal medido,  $y_i$ , em função da concentração do analito,  $x_i$ .

$$Y = a + b.x \quad \text{Equação 6}$$

Onde,  $a$  é a ordenada de origem e  $b$  é o declive da reta.

Esta reta é formada por pares ordenados e independentes,  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_i, y_i), \dots, (x_N, y_N)$ , onde  $N$  corresponde ao número de pontos da reta. O ponto  $(x_i, y_i)$  geralmente representa os valores do branco.

A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual,  $S_{y/x}$ . Este desvio exprime a dispersão dos valores da resposta ao longo da curva de calibração.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde,  $\hat{y}_i$  é uma estimativa calculada do sinal medido. Este valor obtém-se substituindo os valores da concentração do analito na reta obtida,  $\hat{y}_i = a + b.x_i$ .

A cada componente da curva de calibração está também associado os seus respetivos desvios padrão, o desvio padrão do declive,  $S_b$ , e o desvio padrão da ordenada de origem,  $S_a$ .

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 8}$$

$$S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde,  $\bar{x}$  é a média das concentrações das soluções padrão.



Com estes valores, o intervalo de confiança do declive, Equação 10, e da ordenada de origem, Equação 11, podem ser calculados.

$$b \pm t \times S_b \quad \text{Equação 10}$$

$$a \pm t \times S_a \quad \text{Equação 11}$$

Onde, **t** é o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado e (N-2) graus de liberdade, ver anexo 1.

A concentração do analito na amostra, **x<sub>0</sub>**, como já foi referido anteriormente é calculada através da interpolação do valor da resposta do equipamento analítico na curva de calibração. A este valor está associada uma incerteza, que é a combinação da incerteza da determinação do valor medido e a incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão, Equação 12.

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 12}$$

Onde, **ȳ** é a média da resposta do equipamento analítico das diferentes soluções padrão, **ȳ<sub>0</sub>** é a média da resposta do equipamento analítico para as amostras independentes e **n** é o número de ensaios independentes efetuados para a amostra.

Para cada concentração do analito na amostra, **x<sub>0</sub>**, existe um intervalo de confiança, Equação 13.

$$x_0 \pm t \times S_{x_0} \quad \text{Equação 13}$$

Por último, temos o desvio padrão do método, **S<sub>m</sub>**, e o coeficiente de variação do método, **CV<sub>m</sub>**, que permite ao analista concluir sobre a qualidade do método.<sup>42-44</sup>

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 14}$$

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

## 2.4.2 GAMA DE TRABALHO

A gama de trabalho é um intervalo de concentrações no qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável. O limite superior do intervalo corresponde ao limite de quantificação

e o limite inferior corresponde à concentração a partir da qual se observam anomalias significativas na sensibilidade do método.<sup>41</sup>

Para avaliar a gama de trabalho em modelos lineares recorre-se ao uso da norma ISO 8466-1<sup>45</sup> e para modelos polinomiais de 2º grau a norma ISO 8466-2<sup>46</sup>. Segundo a norma ISO 8466-1<sup>45</sup> são analisados a primeira e última solução padrão em 10 réplicas independentes e posteriormente é realizado o teste da homogeneidade das variâncias.

Neste teste, em primeiro lugar são determinadas as variâncias associadas à primeira solução padrão,  $S^2_1$ , e da última solução padrão,  $S^2_{10}$ .

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{Equação 16}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad \text{Equação 17}$$

Onde,  $y_{i,j}$  é o valor da resposta das réplicas independentes e  $n_i$  é o número de réplicas independentes.

Com os valores das variâncias é determinado o valor de PG. Recorre-se à equação 18 quando o  $S^2_{10} > S^2_1$  e à equação 19 quando  $S^2_1 > S^2_{10}$ .

$$PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1} \quad \text{Equação 18}$$

$$PG = \frac{S^2_1}{S^2_{10}} \quad \text{Equação 19}$$

Por último, compara-se o valor obtido PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, ver Anexo 2, para um nível de confiança de 95% e n-1 graus de liberdade no numerador e no denominador.

Se o  $PG \leq F$ , as diferenças entre as variâncias não são significativas, logo conclui-se que a gama de trabalho está ajustada. No caso de o  $PG > F$ , as diferenças entre as variâncias são significativas e a gama de trabalho não está ajustada.<sup>42,44,47,48</sup>

### 2.4.3 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade que é um método analítico tem para fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito.<sup>40,47</sup>

Uma das formas de avaliar este parâmetro é a partir do coeficiente de correlação da curva de calibração, **r** ou **R**. O coeficiente de correlação pode ter valores entre -1 e 0 que representam uma correlação negativa (reta de declive negativo), e valores entre 0 e 1 que representam uma correlação positiva (reta de declive positivo).<sup>42,48</sup>

O cálculo do coeficiente de correlação, **r**, é um dos parâmetros usados para avaliar a curva de calibração.

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Equação 20}$$

Segundo o Guia Relacre 13, em análises químicas as curvas de calibração devem apresentar coeficientes de correlação superiores a 0,995.<sup>42</sup>

A linearidade de um método também pode ser avaliada através de um modelo estatístico, segundo a norma ISO 8466-1<sup>45</sup>, onde calcula-se a função linear e a função não linear de um conjunto de pares ordenados, bem como os respectivos desvios padrão residuais, **S<sub>y/x</sub>** e **S<sub>y2</sub>**, e também a diferença entre as variâncias, **DS<sup>2</sup>**.

$$DS^2 = (N-2) \cdot S_{y/x}^2 - (N-3) \cdot S_{y2}^2 \quad \text{Equação 21}$$

$$S_{y2} =$$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}} \quad \text{Equação 22}$$

Onde, **ŷ<sub>i</sub>** é uma estimativa calculada do sinal medido. Este valor obtém-se substituindo os valores da concentração do analito na função não linear da reta obtida,  $\hat{y}_i = a + b \cdot x_i + c \cdot x_i^2$ .

Seguidamente, calcula-se o valor teste, PG.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad \text{Equação 23}$$

Por último, compara-se o valor obtido PG com o valor tabelo da distribuição F de Snedecor/Fisher, ver Anexo 2, para um nível de confiança de 95%, 1 grau de liberdade no numerador e n-3 graus de liberdade no denominador.

Se o  $PG \leq F$ , a curva de calibração é linear. No caso de o  $PG > F$ , a curva de calibração não é linear.<sup>42,47,48</sup>

## 2.4.4 LIMIARES ANALÍTICOS

Os limiares analíticos são constituídos pelo Limite de Detecção, **LDD**, e pelo Limite de Quantificação, **LDQ**.

Estes limites dependem de diversos fatores que variam no tempo, como por exemplo, contaminações, tipo de amostra, equipamento, operador, entre outros, e por isso devem ser atualizados sempre que se muda de analista, reagentes, equipamento ou local, e sempre que se altera a curva de calibração.<sup>42,44</sup>

### 2.4.4.1 LIMITE DE DETEÇÃO – LDD

O limite de deteção corresponde à concentração mínima, a partir da qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza razoável.

Representa também a menor quantidade do analito que é possível detetar numa amostra, mas não necessariamente quantificá-la, uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos.

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que o analito está ausente.

No caso de o método recorrer a uma calibração linear o limite de deteção é obtido através da equação 24.<sup>36-39</sup>

$$LDD = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (\text{Equação 24})$$

### 2.4.4.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO – LDQ

O limite de quantificação corresponde à mais pequena concentração a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exatidão e precisão.

Em termos práticos, usualmente, o limite de quantificação corresponde ao padrão de menor concentração, excluindo o branco.

No caso de o método recorrer a uma calibração linear o limite de quantificação é obtido através da equação 25.<sup>42,44,47,48</sup>

$$LDQ = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{b} \quad (\text{Equação 25})$$

## 2.4.5 SENSIBILIDADE

A sensibilidade avalia a capacidade de um método em distinguir pequenas variações de concentração do analito. Esta é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração.

A sensibilidade pode ser expressa pelo quociente entre o acréscimo do valor lido,  $\Delta L$ , e a variação da concentração,  $\Delta C$ , correspondente aquele acréscimo, equação 26.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 26})$$

No caso de a curva de calibração ser uma função linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao valor do declive da curva de calibração.<sup>42,47</sup>

## 2.4.6 PRECISÃO

A precisão permite avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra em condições definidas. Deste modo, é possível averiguar se o método é capaz de repetir e reproduzir os resultados obtidos.

A precisão é avaliada através do coeficiente de variação, **CV**, já apresentado anteriormente.

A repetibilidade, **S<sub>r</sub>**, a reprodutibilidade, **S<sub>r</sub>**, e a precisão intermédia, **S<sub>i</sub>**, são métodos utilizados para fazer a análise da precisão.<sup>42,44,48</sup>

### 2.4.6.1 REPETIBILIDADE

A repetibilidade corresponde à precisão dos resultados obtidos em ensaios independentes efetuados em condições de repetibilidade, tais como, mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagente, mesmas condições ambientais, num curto intervalo de tempo.

Para determinar a repetibilidade de um método, são analisados uma série de amostras ou padrões, em condições de repetibilidade. O número de réplicas a realizar deve ser superior ou igual a 10, segundo o Guia Relacre 13.<sup>42</sup> (GUIA)

Através dos resultados obtidos, é calculado o coeficiente de variação da repetibilidade, CV<sub>r</sub>, equação 27.

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \quad (\text{Equação 27})$$

Onde, **S<sub>r</sub>**, é o desvio padrão da repetibilidade e  $\bar{x}$  é a média dos resultados obtidos.<sup>48</sup>

### 2.4.6.3 PRECISÃO INTERMÉDIA

A precisão intermédia corresponde à precisão estimada sobre a mesma amostra/padrões utilizando o mesmo método, mas definindo quais as condições a variar, como por exemplo, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes épocas. Deve-se fazer variar pelo menos uma condição.

O método mais simples de avaliar a precisão intermédia é realizar uma série de medições, em condições pré-definidas, sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou padrões.

A estimativa da precisão intermédia, **S<sub>i0</sub>**, é dada pela equação 28, que corresponde ao desvio padrão de precisão intermédia referente à gama em estudo.

$$S_{i0} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (\text{Equação 28})$$

Onde, **n** é o número de réplicas, **y<sub>k</sub>** é o resultado individual obtido e  $\bar{y}$  representa a média dos resultados individuais obtidos.<sup>42,48</sup>

### 2.4.7 EXATIDÃO

A exatidão de um método é definida como a amplitude/concordância entre o valor obtido a partir do método e o valor tomado como verdadeiro. Este parâmetro pode ser estimado com base em análise de materiais de referência certificados (MRC), a participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) e a realização de ensaios de recuperação.<sup>44,47</sup>

Neste trabalho apenas é abordada a avaliação da exatidão através de ensaios de recuperação.

Os ensaios de recuperação mostram a quantidade de analito que é recuperado numa amostra fortificada. A taxa de recuperação tem como objetivo verificar se existem erros sistemáticos a serem introduzidos por causas desconhecidas.

O procedimento dos ensaios de recuperação consiste na adição de uma quantidade controlada de padrão a uma amostra de concentração conhecida do analito, para verificar a quantidade de analito que se consegue obter.

A taxa de recuperação, **R(%)**, é obtida através da equação 29.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \quad (\text{Equação 29})$$

Onde, **C<sub>1</sub>** é a concentração obtida pela curva de calibração, **C<sub>2</sub>** e a concentração da amostra sem a fortificação e **C<sub>3</sub>** é a concentração da fortificação.

Os ensaios de recuperação devem ser realizados ao longo de toda a gama de trabalho. A taxa de recuperação ideal é de 100%, mas o critério de aceitação para a taxa de recuperação é normalmente entre 80 % e 110 %. Mediante a concentração e a complexidade da matriz a percentagem é alterada. Na tabela 2 estão representadas as taxas de recuperação para cada nível de concentração.<sup>44,48</sup>

**Tabela 2.** Concentração do analito e respetivas taxas de recuperação.<sup>37</sup>

<b>Substância ativa (%)</b>	<b>R(%)</b>
100%	98-102
≥10	98-102
≥1	97-103
≥0,1	95-105
≥0,01	90-107
≥0,001	80-110
≥0,0001	80-110
≥0,00001	80-110
≥0,000001	60-115
≥0,0000001	40-120

Para confirmar a exatidão de um método pode-se realizar o Teste t, que compara o valor médio,  $\bar{x}$ , com um valor de referência,  $x_{ref}$ .

Em primeiro calcula-se o valor  $t_{exp}$  pela equação 30.

$$t_{exp} = \frac{(\bar{x} - x_{ref}) \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (\text{Equação 30})$$

Onde,  $s$  o desvio padrão relativo à taxa de recuperação e  $n$  o número de réplicas.

Por último comparamos o módulo do valor  $t_{exp}$  com o valor  $t_{tab}$ , valor da variável de Student para o nível de confiança desejado é (N-1) graus de liberdade.

Se  $|t_{exp}| \leq t_{tab}$ ,  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  não apresentam diferenças significativas, o que significa que não foi estatisticamente evidenciado a existência de desvios, erros sistemáticos. Se  $|t_{exp}| > t_{tab}$ ,  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  apresentam diferenças significativas, o que significa que foi estatisticamente evidenciado a existência de desvios, erros sistemáticos.<sup>42</sup>



# **CAPÍTULO 3**

Parte Experimental

### 3.1 AMOSTRAGEM

A amostra de tecido tratada com o Si Repel Mosquito® 101-TF para análise foi fornecida pela empresa. O tecido é composto por 35% de algodão e 65% de poliéster. O produto Si Repel Mosquito® 101-TF foi aplicado por impregnação, um dos métodos tradicionais de aplicação de acabamentos químicos, como referido no Capítulo “2.1.1 Acabamentos Químicos”.

Na aplicação do produto Si Repel Mosquito® 101-TF, são utilizados outros compostos para além da substância ativa. Estes compostos não podem ser identificados, uma vez que a formulação do produto é confidencial, e por este motivo os mesmos serão representados por uma letra (A, B ou C).

Na tabela 3 está apresentada a massa (em gramas) dos diferentes compostos presentes em 1 g de tecido após a aplicação do Si Repel Mosquito® 101-TF. Os cálculos destes valores não podem ser apresentados pois contêm informação, como por exemplo, receitas e formulações, que são matéria confidencial da empresa.

**Tabela 3.** Massa dos compostos por grama de tecido, após a aplicação do produto.

<b>Produtos</b>	<b>Massa em gramas por cada grama de tecido</b>
IR3535	0,0171
A	0,0113
B	0,0167
C	0,0144

### 3.2 REAGENTES

Na tabela 4 estão apresentados os reagentes utilizados nas extrações e na preparação das soluções padrão.

**Tabela 4.** Lista de características dos reagentes utilizados nas extrações e na preparação de soluções padrão.

<b>Reagente</b>	<b>CAS</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>M (g/mol)</b>	<b><math>\rho</math> a 25° C (g/cm³)</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Marca</b>
IR3535	52304-36-6	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	215,29	0,998	98	Merk
Etanol	64-17-5	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	0,789	99,8	Fisher Scientific
Isopropanol	67-63-0	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	60,10	0,786	99	Valente e Ribeiro
Acetonitrilo	75-05-8	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	41,04	0,786	99	Fisher Scientific

### 3.3 CONDIÇÕES DE ANÁLISE UV-VIS

Para a quantificação dos compostos utilizou-se o Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601, de duplo feixe. As cuvetes eram de quartzo, com um volume de 500  $\mu$ L e percurso ótico de 1 cm. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimentos de onda entre 200 e 600 nm. Os dados foram adquiridos com o software UV-1601 e para tratamento dos mesmos utilizou-se o Excel.

### 3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS TÊXTEIS

O procedimento de extração da amostra de tecido foi adaptado de 49.

A amostra de tecido, primeiramente, foi cortada em pequenos quadrados de forma uniforme com 0,5 cm de aresta, figura 7.



**Figura 7.** Amostra de tecido cortada em quadrados com 0,5 cm de aresta.

Para a extração pesou-se  $0,5 \pm 0,001$  g, adicionou-se 10 mL de solvente e deixou-se em agitação durante 10 minutos, figura 8. Ao fim dos 10 minutos de agitação, decantou-se a solução para um frasco e reservou-se. Ao mesmo tecido adicionou-se mais 10 mL de solvente e deixou-se novamente em agitação durante 10 minutos. Estes passos foram repetidos até serem realizadas cinco extrações, para no final termos uma solução de 50 mL.



**Figura 8.** Amostra de tecido em agitação com o solvente.

Após as cinco extrações, submeteram-se os 50 mL de solução resultante da extração mais o tecido a um banho ultrassónico durante 10 minutos, figura 9.



**Figura 9.** Banho ultrassónico.

As soluções foram analisadas posteriormente por espectroscopia de UV-VIS.

Neste processo de extração utilizou-se três solventes diferentes com o objetivo de avaliar qual dos três teria melhor rendimento na extração. A escolha dos solventes teve em conta a solubilidade do composto IR3535, que está diretamente relacionada com a sua polaridade, moléculas polares têm uma maior solubilidade em solventes polares.<sup>50</sup> Visto que o composto IR3535 é uma molécula polar<sup>23</sup>, a principal característica dos solventes a escolher seria serem solventes polares. Posto isto, os solventes escolhidos foram o Acetonitrilo, o Isopropanol e o Etanol.

O procedimento acima descrito foi repetido três vezes de forma independente para cada solvente.

### **3.5 ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS**

Como já foi apresentado anteriormente, a Lei de Lambert-Beer é acumulativa. Neste caso, a solução a analisar contém os diferentes compostos utilizados no tratamento do tecido resultante do processo de extração, e por conseguinte a absorvância medida será o resultado da soma das absorvâncias de cada um dos compostos.

Devido a isto, numa primeira fase do trabalho avaliou-se os espectros dos diferentes compostos, com o objetivo de perceber qual a influência que os diferentes compostos teriam nas absorvâncias das soluções de extração.

Para tal, preparou-se soluções dos diferentes compostos, IR3535, A, B e C, com as concentrações apresentadas na tabela 5, nos diferentes solventes. Posteriormente realizou-se as análises das soluções no espectrofotómetro de UV-VIS e por último traçou-se e analisou-se os respetivos espetros.

**Tabela 5.** Concentrações usadas na preparação das soluções nos diferentes solventes.

<b>Produtos</b>	<b>Concentração (mol/L)</b>
IR3535	$(3,9 \pm 0,9) \times 10^5$
A	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^4$
B	$(3,6 \pm 0,8) \times 10^5$
C	$(6,5 \pm 0,2) \times 10^6$

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO

Para a quantificação do IR3535 preparou-se a solução mãe de concentração  $(1,16 \pm 0,05) \times 10^4$  mol/L, e a partir desta preparou-se cinco soluções padrão de diferentes concentrações. No caso do composto C preparou-se a solução mãe de concentração  $(2,2 \pm 0,1) \times 10^5$  mol/L, e a partir desta preparou-se cinco soluções padrão de diferentes concentrações.

Posteriormente, analisou-se as soluções no espectrofotómetro UV-VIS de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.2.2. Para a construção das curvas de calibração, utilizou-se os valores da absorvância medidos em função das respetivas concentrações das soluções padrão e obteve-se a reta de cada curva de calibração.

### 3.7 RENDIMENTO

Para o cálculo do rendimento utilizou-se a equação 31.

$$\eta = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (\text{Equação 31})$$

Para o cálculo da concentração teóricas do composto IR3535 na amostra após a extração, apresentada na tabela 6, utilizou-se os valores de massa por grama de tecido apresentados na tabela 4 e considerou-se uma extração 100% eficaz, ver Anexo 3.

**Tabela 6.** Concentrações teóricas do IR3535 e do Composto C nas amostras após a extração.

<b>Produtos</b>	<b>C<sub>teórica</sub> (mol/L)</b>
IR3535	$7,9 \times 10^4$

## **3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

### **3.8.1 GAMA DE TRABALHO**

Para avaliar a gama de trabalho do método realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias. Para tal, preparou-se 10 réplicas independentes da solução padrão mais concentrada e da solução padrão menos concentrada, 1 e 5 respetivamente.

### **3.8.2 LINEARIDADE**

Para avaliar a linearidade do método avaliou-se o coeficiente de correlação da curva de calibração e realizou-se o modelo estatístico descrito na norma ISO 8466-1<sup>45</sup>.

### **3.8.3 LIMIARES ANALÍTICOS**

Para determinar os limiares analíticos utilizou-se as equações 24 e 25, já apresentadas anteriormente.

### **3.8.4 PRECISÃO**

Para avaliar a precisão do método estudou-se a repetibilidade e a precisão intermédia.

Na repetibilidade, preparou-se 10 réplicas independentes da solução padrão mais concentrada e da solução padrão menos concentrada, 1 e 5 respetivamente.

Na precisão intermédia, analisou-se duas soluções padrão, 1 e 5, em triplicado de 4 em 4 dias.

### **3.8.5 EXATIDÃO**

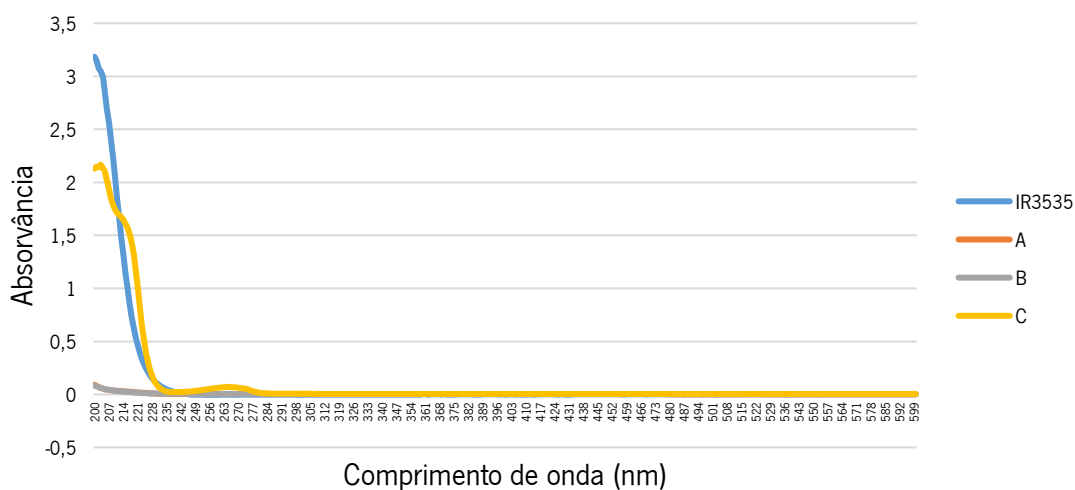
Para avaliar a exatidão do método realizou-se ensaios de recuperação envolvendo três níveis de concentração e, para cada nível, efetuadas três determinações. Este ensaio consistiu na adição de quantidades conhecidas de analito, sob uma matriz de branco, estimando-se as percentagens das taxas de recuperação e posteriormente realizou-se o Test t.

# **CAPÍTULO 4**

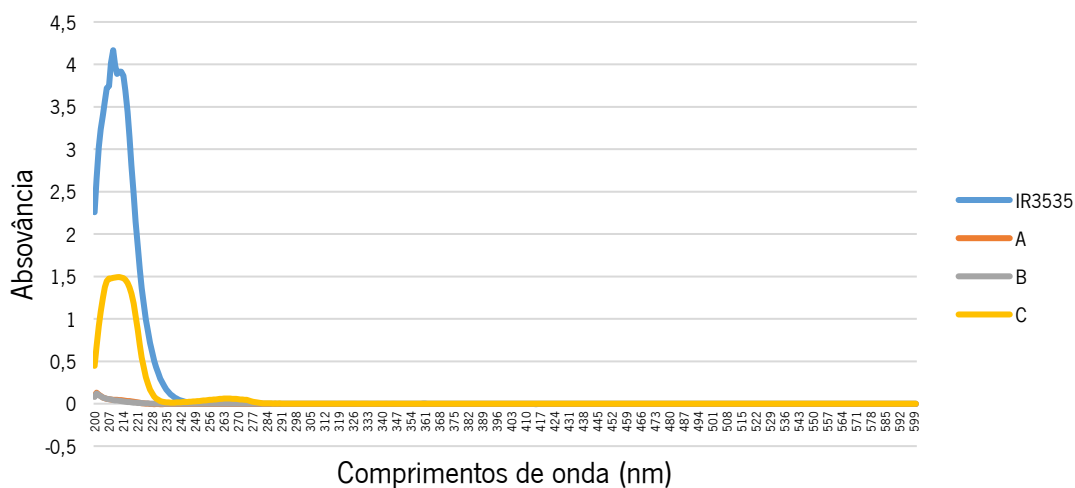
Apresentação e discussão dos resultados

## 4.1 ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS, QUANTIFICAÇÃO E RENDIMENTO

Numa primeira fase deste estudo foram analisados os espectros dos compostos IR3535, A, B e C nos diferentes solventes de extração, o Acetonitrilo, o Etanol e o Isopropanol, figura 10, 11 e 12, respetivamente.

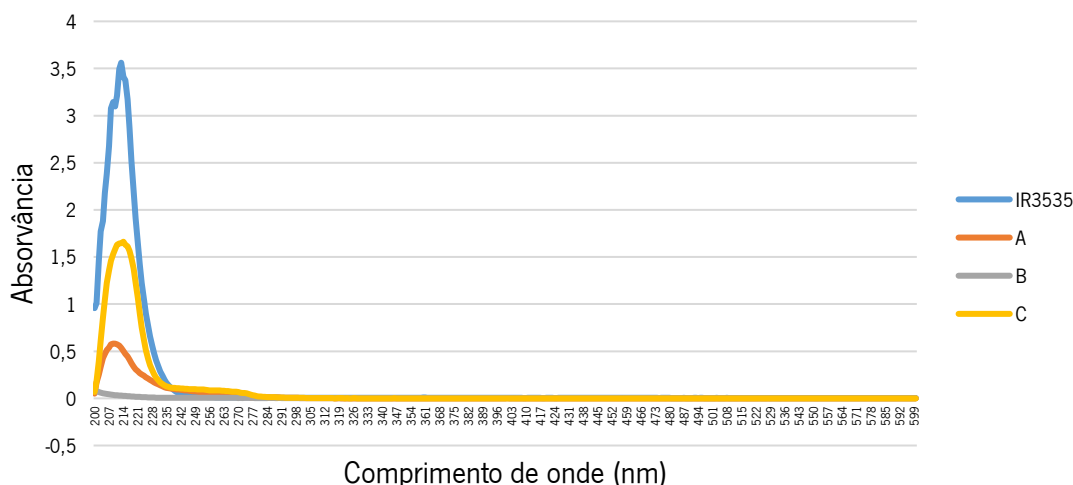


**Figura 10.** Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Acetonitrilo.



**Figura 11.** Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Etanol.





**Figura 12.** Espectros UV-VIS dos compostos IR3535, A, B e C no solvente Isopropanol.

Analisando em particular cada espectro pode-se constatar que os compostos IR3535 e o C são aqueles que terão maior influência na absorvância da solução obtida após o processo de extração, absorvância essa que pode ser representada pela equação 32, que pode ser reescrita, substituindo-se as absorvâncias de cada composto pela respetiva equação, equação 33.

$$A_{\text{solução}} = A_{\text{IR3535}} + A_{\text{C}} \quad (\text{Equação 32})$$

$$A_{\text{solução}} = (\epsilon_{\text{IR3535}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{C}} \times C_{\text{C}}) \quad (\text{Equação 33})$$

Perante esta análise, para quantificar o IR3535 foi necessário determinar as absorvidades molares,  $\epsilon$ , do IR3535 e do Composto C nos diferentes solventes. Para a determinação das absorvidades molares, procedeu-se à construção das curvas de calibração nos comprimentos de onda máximos de cada composto nos diferentes solventes.

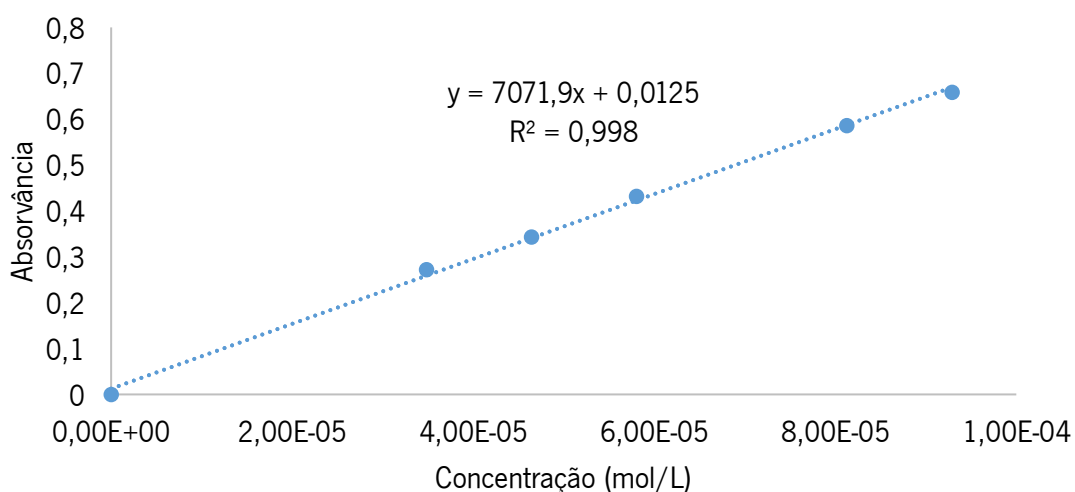
Posteriormente através de um sistema de equações, determinou-se a quantidade de IR3535 extraída pelos diferentes solventes e por último, calculou-se o rendimento para cada solvente.

Na tabela 7 são apresentados os comprimentos de onda máximos, quer do IR3535 quer do Composto C nos diferentes solventes, retirados da análise das figuras 10, 11 e 12.

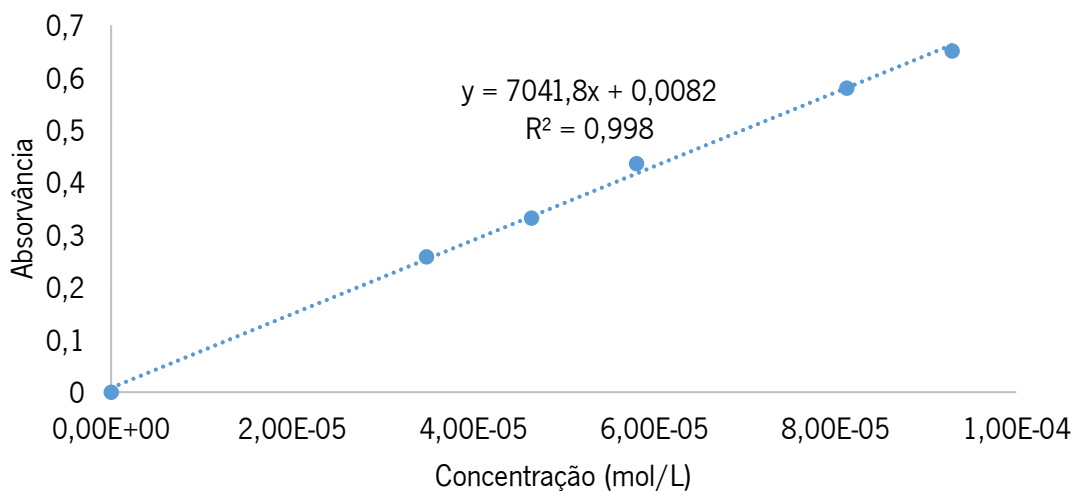
**Tabela 7.** Comprimentos de onda máximos para ambos os compostos.

<b>Solvente</b>	<b>Composto</b>	<b>Comprimento de onda máximo (nm)</b>
<b>Acetonitrilo</b>	<b>IR3535</b>	200
	<b>C</b>	203
<b>Etanol</b>	<b>IR3535</b>	209
	<b>C</b>	212
<b>Isopropanol</b>	<b>IR3535</b>	213
	<b>C</b>	214

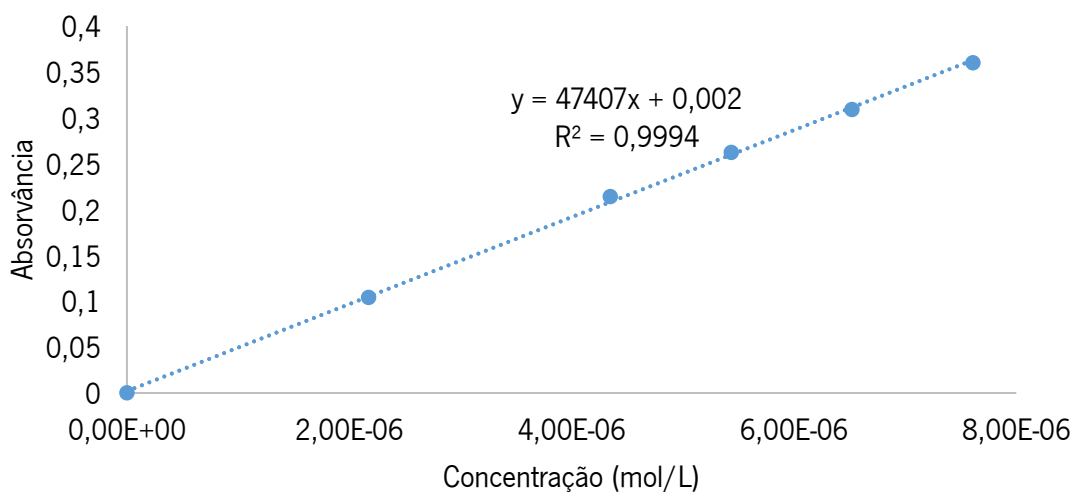
Da figura 13 a 16, estão apresentadas as curvas de calibração dos compostos IR3535 e C nos diferentes comprimentos de onda máximos no solvente Acetonitrilo, da figura 17 a 20 estão apresentadas as curvas de calibração dos compostos IR3535 e C nos diferentes comprimentos de onda máximos no solvente Etanol e da figura 21 a 24 estão apresentadas as curvas de calibração dos compostos IR3535 e C nos diferentes comprimentos de onda máximos no solvente Isopropanol.



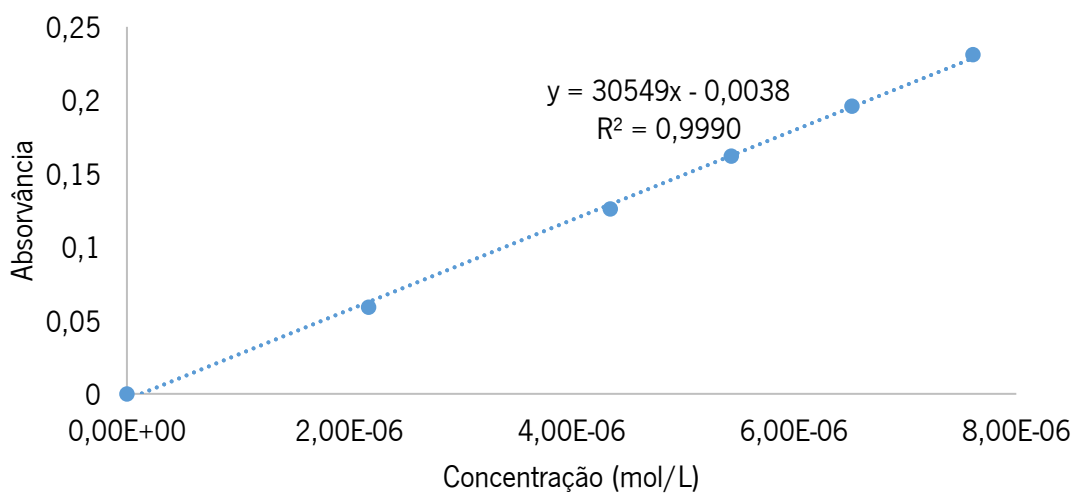
**Figura 13.** Curva de calibração do composto IR3535 no comprimento de onda de 200 nm no solvente Acetonitrilo.



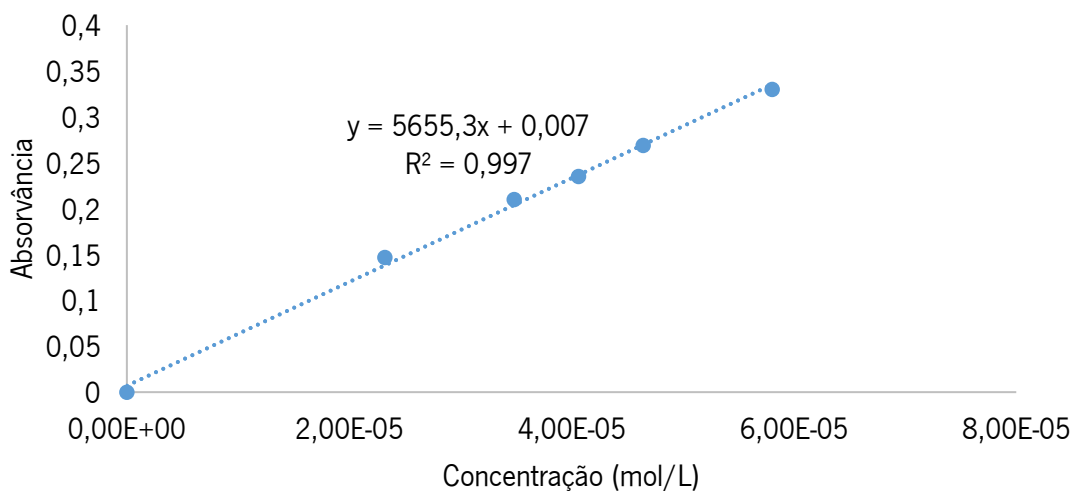
**Figura 14.** Curva de calibração do composto IR3535 no comprimento de onda de 203 nm no solvente Acetonitrilo.



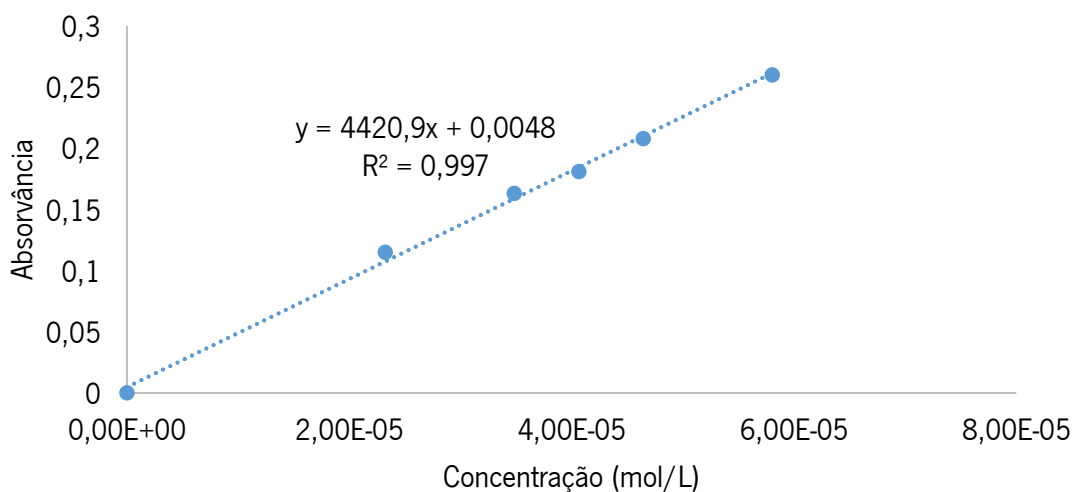
**Figura 15.** Curva de calibração do composto C no comprimento de onda de 200 nm no solvente Acetonitrilo.



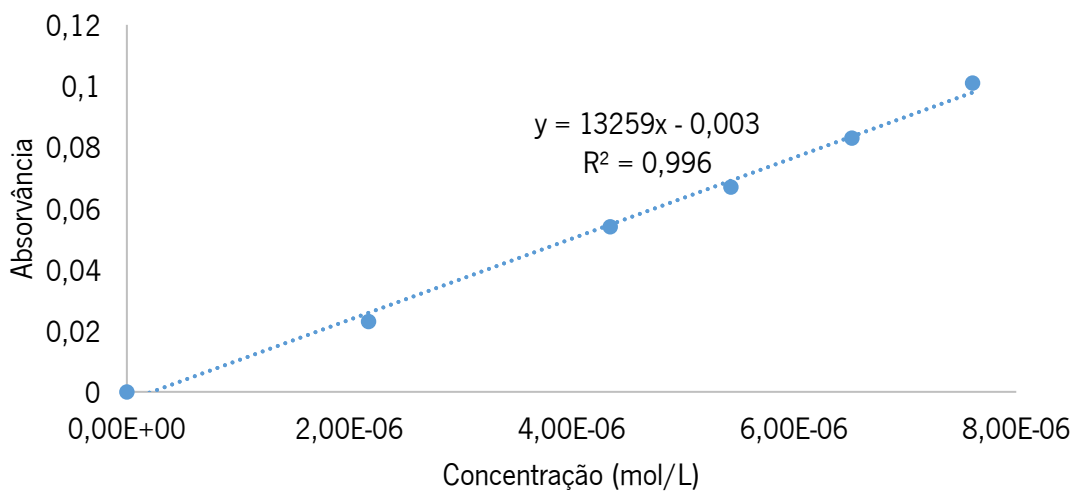
**Figura 16.** Curva de calibração do composto C no comprimento de onda de 203 nm no solvente Acetonitrilo.



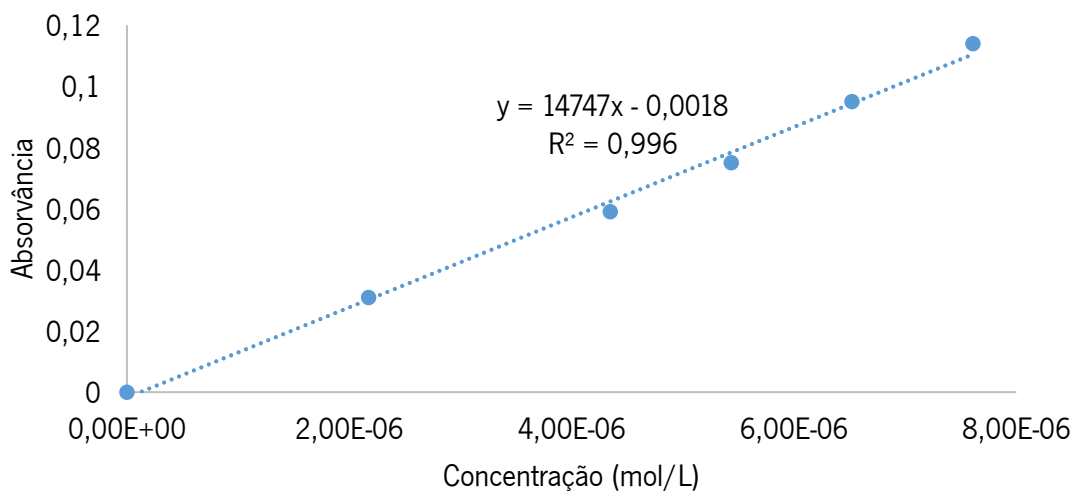
**Figura 17.** Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 209 nm no solvente Etanol.



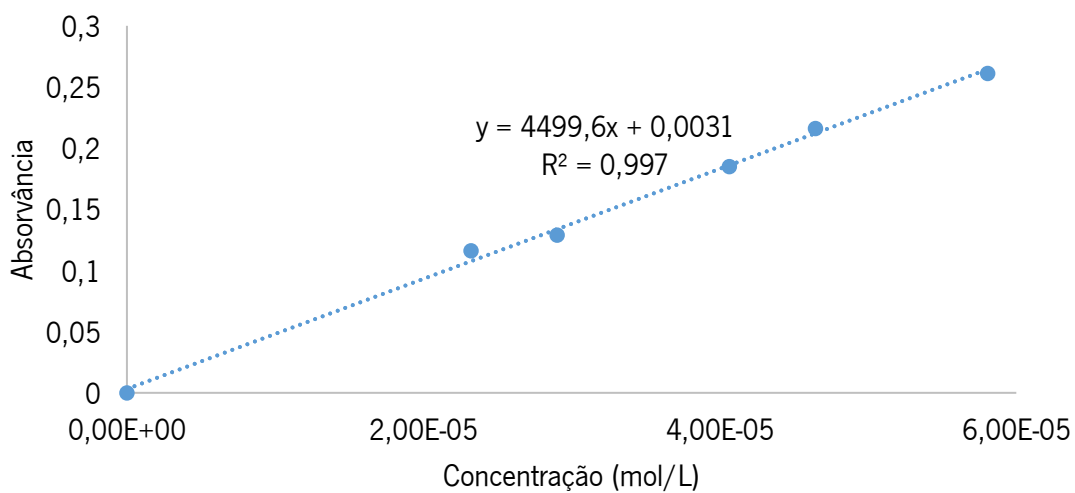
**Figura 18.** Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 212 nm no solvente Etanol.



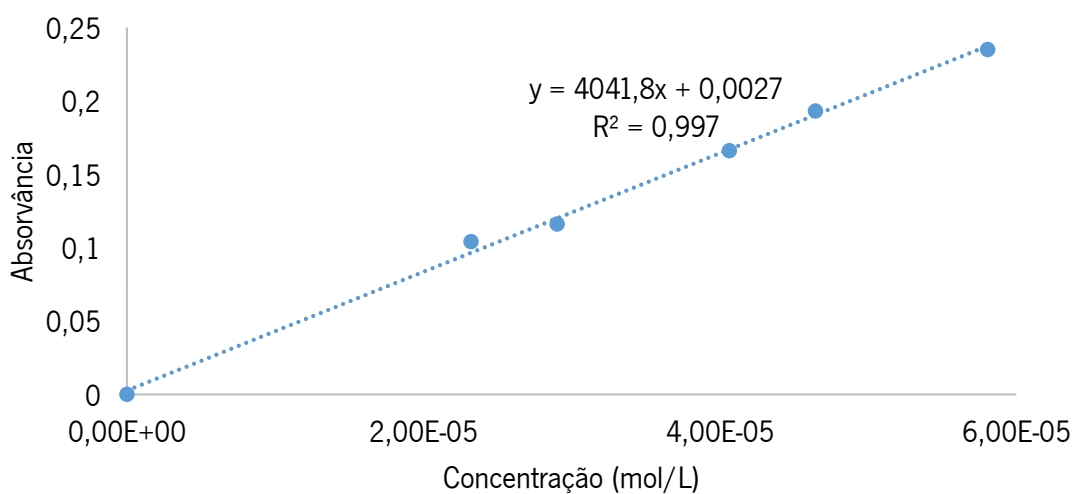
**Figura 19.** Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 209 nm no solvente Etanol



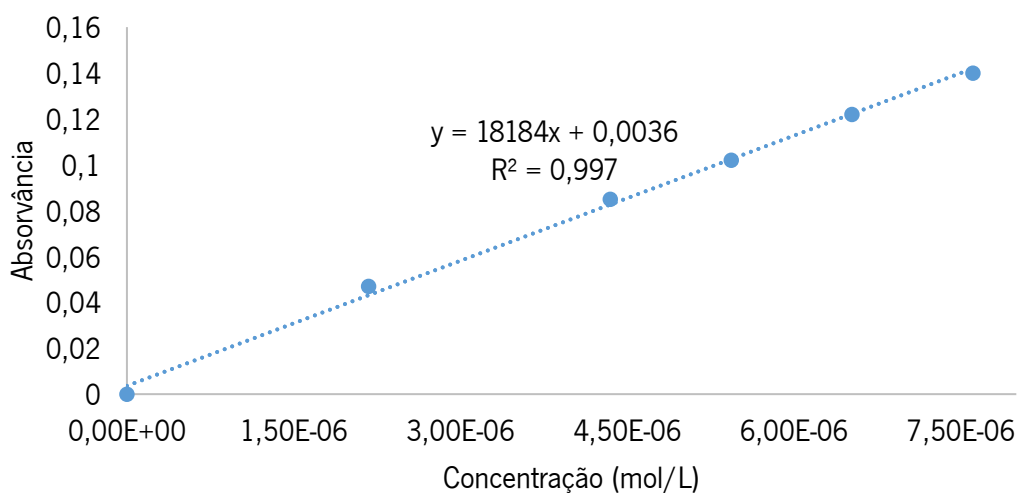
**Figura 20.** Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 212 nm no solvente Etanol



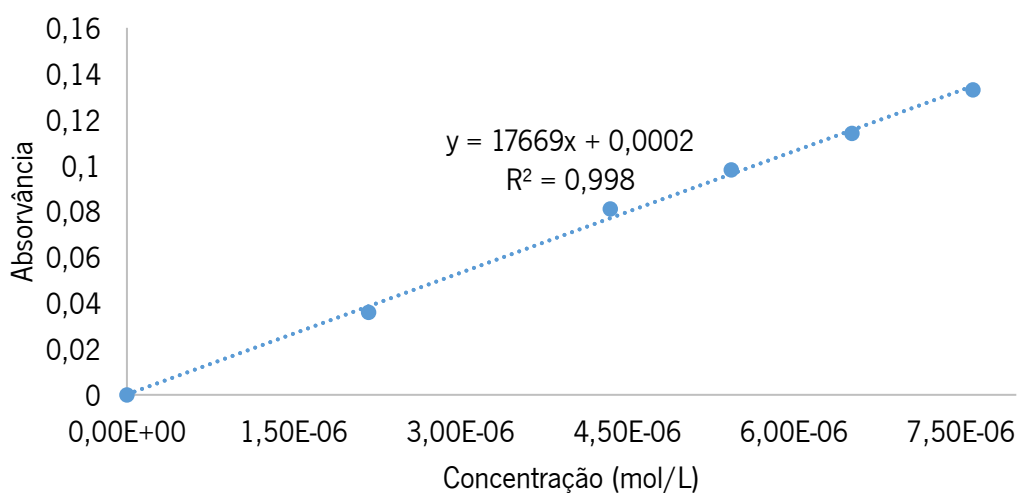
**Figura 21.** Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 213 nm no solvente Isopropanol.



**Figura 22.** Curva de calibração do IR3535 no comprimento de onda de 214 nm no solvente Isopropanol.



**Figura 23.** Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 213 nm no solvente Isopropanol.



**Figura 24.** Curva de calibração do Composto C no comprimento de onda de 214 nm no solvente Isopropanol.

Analisando as curvas de calibração e as respectivas equações das retas, foram obtidos os seguintes dados: Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Acetonitrilo, tabela 8; Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Etanol, tabela 9; Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Isopropanol, tabela 10.

**Tabela 8.** Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Acetonitrilo.

<b>Composto</b>	<b><math>\epsilon</math> a 200 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>	<b><math>\epsilon</math> a 203 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>
<b>IR3535</b>	7071,9	7041,8
<b>C</b>	47407	30549

**Tabela 9.** Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Etanol.

<b>Composto</b>	<b><math>\epsilon</math> a 209 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>	<b><math>\epsilon</math> a 212 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>
<b>IR3535</b>	5655,3	4420,9
<b>C</b>	13259	14747

**Tabela 10.** Absortividades molares do IR3535 e do Composto C, nos diferentes comprimentos de onda máximos, no solvente Isopropanol.

<b>Composto</b>	<b><math>\epsilon</math> a 213 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>	<b><math>\epsilon</math> a 214 nm (<math>M^{-1} cm^{-1}</math>)</b>
<b>IR3535</b>	4499,6	4041,8
<b>C</b>	18184	17669

Para a quantificação do IR3535, realizou-se o processo de extração em triplicado para cada solvente, como descrito no Capítulo “3.4 Extração e análise das amostras têxteis”. Para cada solvente obteve-se três valores de absorvância, dos quais se calculou as médias, valores apresentados na tabela 11, 12 e 13.

**Tabela 11.** Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Acetonitrilo nos diferentes comprimentos de onda máximos.

	<b>200 nm</b>	<b>203 nm</b>
	3,864	3,837
<b>Absorvância</b>	4,039	3,888
	3,818	3,918
<b>Média</b>	3,907	3,878

**Tabela 12.** Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Etanol nos diferentes comprimentos de onda máximos.

	<b>209 nm</b>	<b>212 nm</b>
	3,792	3,855
<b>Absorvância</b>	3,808	3,720
	3,776	3,841
<b>Média</b>	3,792	3,805

**Tabela 13.** Absorvância obtida para a solução de extração com o solvente Isopropanol nos diferentes comprimentos de onda máximos.

	<b>213 nm</b>	<b>214 nm</b>
	3,145	3,111
<b>Absorvância</b>	3,057	3,031
	3,057	3,142
<b>Média</b>	3,086	3,094

Posto isto, para cada solvente escreveu-se um sistema de duas equações, reescrevendo a equação 33, anteriormente apresentada, ficando como incógnitas a concentração do IR3535 e do composto C. Na equação 34 utilizou-se os dados apresentados nas tabelas 8 e 11, que corresponde à extração com o solvente Acetonitrilo. Na equação 35 utilizou-se os dados apresentados nas tabelas 9 e 12, que corresponde à extração com o solvente Etanol. Na equação 36 utilizou-se os dados apresentados nas tabelas 10 e 13, que corresponde à extração com o solvente Isopropanol.

$$\begin{cases}
 A_{\text{mistura}, 200 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 200 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 200 \text{ nm}} \\
 A_{\text{mistura}, 203 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 203 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 203 \text{ nm}}
 \end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
 A_{\text{mistura}, 200 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 200 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 200 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}}) \\
 A_{\text{mistura}, 203 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 203 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 203 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}})
 \end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
 3,907 = (7071,9 \times C_{\text{IR3535}}) + (47497 \times C_{\text{Composto C}}) \\
 3,878 = (7041,9 \times C_{\text{IR3535}}) + (30549 \times C_{\text{Composto C}})
 \end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
 C_{\text{IR3535}} = 5,475 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \\
 C_{\text{Composto C}} = 7,460 \times 10^{-7} \text{ mol/L}
 \end{cases} \quad (\text{Equação 34})$$



$$\begin{cases}
A_{\text{mistura}, 209 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 209 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 209 \text{ nm}} \\
A_{\text{mistura}, 212 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 212 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 212 \text{ nm}}
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
A_{\text{mistura}, 209 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 209 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 209 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}}) \\
A_{\text{mistura}, 212 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 212 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 212 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}})
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
3,792 = (5655,3 \times C_{\text{IR3535}}) + (13259 \times C_{\text{Composto C}}) \\
3,804 = (4420,9 \times C_{\text{IR3535}}) + (14747 \times C_{\text{Composto C}})
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
C_{\text{IR3535}} = 2,213 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \\
C_{\text{Composto C}} = 1,91 \times 10^{-4} \text{ mol/L}
\end{cases} \quad (\text{Equação 35})$$

$$\begin{cases}
A_{\text{mistura}, 213 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 213 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 213 \text{ nm}} \\
A_{\text{mistura}, 214 \text{ nm}} = A_{\text{IR3535}, 214 \text{ nm}} + A_{\text{Composto C}, 214 \text{ nm}}
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
A_{\text{mistura}, 213 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 213 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 213 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}}) \\
A_{\text{mistura}, 214 \text{ nm}} = (\epsilon_{\text{IR3535}, 214 \text{ nm}} \times C_{\text{IR3535}}) + (\epsilon_{\text{Composto C}, 214 \text{ nm}} \times C_{\text{Composto C}})
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
3,086 = (4499,6 \times C_{\text{IR3535}}) + (18184 \times C_{\text{Composto C}}) \\
3,094 = (4041,8 \times C_{\text{IR3535}}) + (14669 \times C_{\text{Composto C}})
\end{cases}$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases}
C_{\text{IR3535}} = -2,888 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \\
C_{\text{Composto C}} = 2,411 \times 10^{-4} \text{ mol/L}
\end{cases} \quad (\text{Equação 36})$$

Obtendo a concentração experimental extraída de IR3535 por cada solvente é possível calcular o rendimento usando a equação 31, anteriormente já apresentada. Apenas se fez o cálculo do rendimento para o composto IR3535 pois o principal objetivo deste trabalho é quantificar apenas o composto IR3535 extraído das amostras.

Na extração com o solvente Acetonitrilo, obteve-se uma concentração experimental de  $5,475 \times 10^{-4}$  mol/L, da qual resultou um rendimento de 69%. Para o solvente Etanol, obteve-se uma concentração experimental de  $2,213 \times 10^{-4}$  mol/L, da qual resultou um rendimento de 28%. No caso da extração com o solvente Isopropanol, como obteve-se uma concentração negativa, para o cálculo do rendimento considerou-se uma concentração experimental do composto IR3535 igual a 0, do qual se obteve um rendimento de 0%, o que permite concluir que o solvente Isopropanol não conseguiu extrair o composto IR3535 das amostras. Estes resultados são apresentados na tabela 14.

**Tabela 14.** Concentrações experimentais do IR3535 e rendimentos de cada extração com os diferentes solventes.

<b>Solvente</b>	<b>C<sub>Experimental</sub> (mol/L)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Acetonitrilo</b>	$5,475 \times 10^{-4}$	69
<b>Etanol</b>	$2,213 \times 10^{-4}$	28
<b>Isopropanol</b>	0	0

Perante os resultados do rendimento, para a realização da validação do método selecionou-se o solvente com maior rendimento, o Acetonitrilo.

## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método efetuou-se em dois processos. No primeiro processo procedeu-se ao estudo dos diferentes parâmetros da validação de um método, já anteriormente referidos, para o composto IR3535. No segundo processo, apenas realizou-se o estudo da calibração e da linearidade para o Composto C. Isto acontece porque o principal objetivo deste trabalho é quantificar o composto IR3535 e não o Composto C.

Para o cálculo dos diferentes parâmetros de validação do método as fórmulas utilizadas são as que foram apresentadas ao longo do Capítulo “2.4 Validação do método”. Os cálculos intermédios estão apresentados no Anexo 4.

### a) IR3535

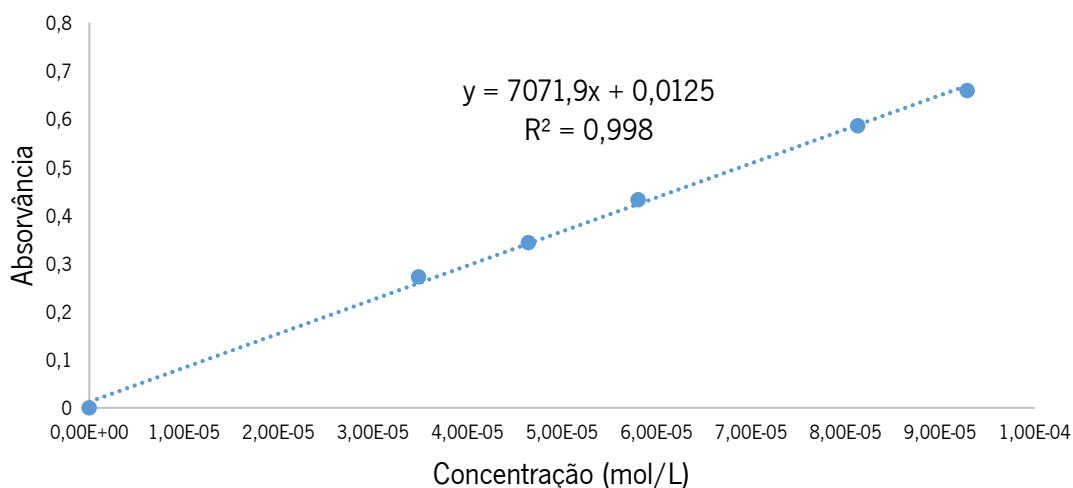
#### 4.2.1 CALIBRAÇÃO

Para a construção da curva de calibração, analisou-se em separados as soluções padrão com o IR3535 feitas a partir da solução mãe. Os valores obtidos são apresentados na tabela 15.

**Tabela 15.** Valores de absorvância medidos para cada solução padrão.

<b>Padrão</b>	<b>C (mol/L)</b>	<b>A (200 nm)</b>
<b>Branco</b>	0	0
<b>1</b>	$(9,3 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	0,659
<b>2</b>	$(8,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	0,586
<b>3</b>	$(5,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	0,432
<b>4</b>	$(4,6 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	0,343
<b>5</b>	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	0,272

Na figura 25 é apresentada a curva de calibração obtida da relação linear entre as absorvâncias e as respectivas concentrações das soluções padrão, assim como a equação da respetiva reta e o valor do coeficiente de correlação.



**Figura 25.** Curva de calibração referente às soluções padrão com o IR3535.

A equação da reta pode ser reescrita tendo em conta as incertezas associadas ao declive ( $S_b$ ) e à ordenada na origem ( $S_a$ ):  $y = (b \pm t.S_b)x + (a \pm t.S_a)$

Mediante estes pressupostos a equação da reta final é:

$$y = (7071 \pm 425)x + (0,01 \pm 0,03)$$

A concentração do IR3535 na amostra,  $x_0$ , foi calculada através da interpolação do valor médio das absorvâncias obtidas na curva de calibração. A este valor está associada uma incerteza: ( $X_0 \pm t.S_{x_0}$ )

Mediante estes pressupostos a concentração experimental do IR3535 é:

$$C = (5,5 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

Posteriormente calculou-se o desvio padrão do método,  $S_m$ , e o coeficiente de variação do método,  $CV_m$ , valores apresentados na tabela 16.

**Tabela 16.** Valores obtidos para o desvio padrão e coeficiente de variação do método.

$S_m$	$CV_m$
$1,62 \times 10^{-6}$	3,10 %

## 4.2.2 GAMA DE TRABALHO

De forma a avaliar a gama de trabalho, analisou-se os padrões 1 e 5, com 10 réplicas independentes de cada, e realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias, utilizando os resultados obtidos apresentados na tabela 17.

**Tabela 17.** Valores obtidos no estudo da gama de trabalho.

<b>Ensaio</b>	<b>Padrão 1</b>	<b>Padrão 5</b>
<b>1</b>	0,659	0,239
<b>2</b>	0,663	0,213
<b>3</b>	0,666	0,225
<b>4</b>	0,650	0,227
<b>5</b>	0,655	0,212
<b>6</b>	0,663	0,275
<b>7</b>	0,642	0,225
<b>8</b>	0,663	0,234
<b>9</b>	0,645	0,235
<b>10</b>	0,634	0,223

De seguida, foi calculado o valor PG, sendo depois comparado com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/Fischer, para 95% de probabilidade e 9 graus de liberdade, valores apresentados na tabela 18.

**Tabela 18.** Valores obtidos no teste da homogeneidade das variâncias.

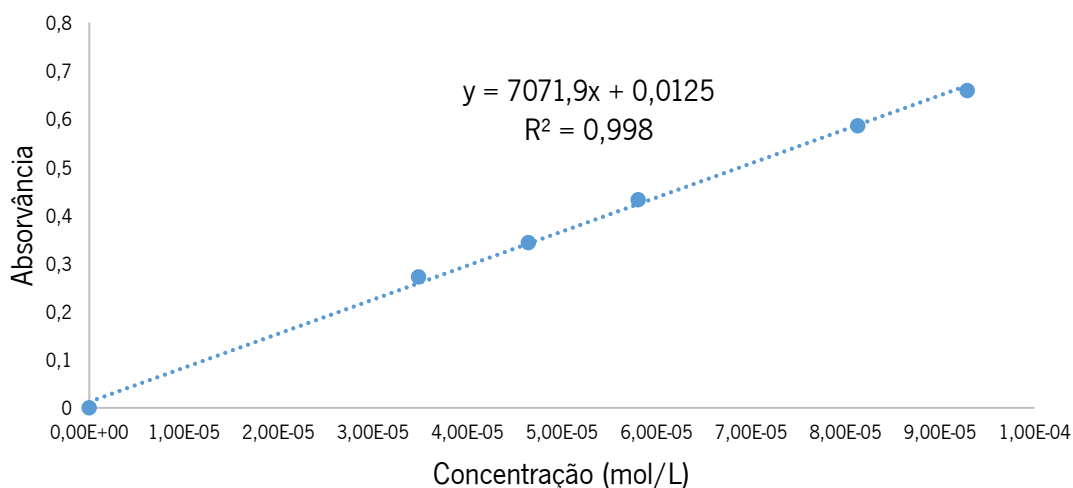
<b>PG</b>	<b>F</b>
2,175	4,026

O PG calculado é de 2,715, sendo inferior ao valor tabelado, o que permite concluir que as variâncias não diferem significativamente. Posto isto, pode-se afirmar que a gama de trabalho está bem ajustada.

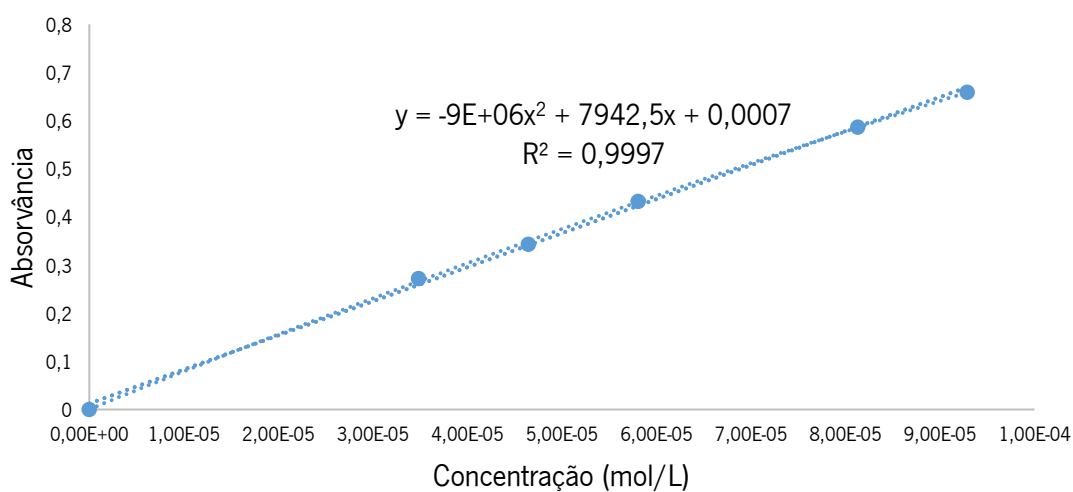
## 4.2.3 LINEARIDADE

Para o estudo da linearidade da curva de calibração, inicialmente realizou-se uma análise visual, onde a mesma aparenta ter um bom ajuste linear e avaliou-se o coeficiente de correlação,  $R=0,998$ , que de acordo com o Guia Relacre13 representa uma boa correlação.

Numa segunda abordagem avaliou-se a linearidade através de um modelo estatístico, segundo a norma ISO 8466-1, onde foi calculada a função linear e a função não linear, figura 26 e 27, respetivamente.



**Figura 26.** Regressão linear do método.



**Figura 27.** Regressão polinomial do método.

Através das regressões foi possível calcular os respetivos desvios padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y_2}$ , a diferença de variâncias,  $DS^2$ , e o valor PG, valores apresentados na tabela 19.

**Tabela 19.** Valores obtidos para o estudo da linearidade.

$S_{y/x}$	$S_{y_2}$	$DS^2$	PG	F
0,0114	0,00540	0,000436	14,9	864,2

O PG calculado é de 14,9 sendo inferior ao valor tabelado, o que permite concluir que a curva de calibração é linear.

#### 4.2.4 LIMIARES ANALÍTICOS

A determinação dos limiares analíticos foi efetuada através do estudo da curva de calibração obtida, com base nas fórmulas apresentadas no Capítulo “2.4.4 Limiares Analíticos”.

Os valores obtidos experimentalmente para o limite de deteção e limite de quantificação estão apresentados na tabela 20.

**Tabela 20.** Valores obtidos no cálculo dos limiares analíticos.

<b>LDD</b>	<b>LDQ</b>
$5,34 \times 10^{-6}$ mol/L	$1,62 \times 10^{-5}$ mol/L

#### 4.2.5 SENSIBILIDADE

A sensibilidade do método, como a curva de calibração é uma função linear, é constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao valor do declive da curva de calibração, 7071,9.

#### 4.2.6 PRECISÃO

A avaliação da precisão do método divide-se em dois estudos, o da repetibilidade e o da precisão intermédia.

Para o estudo da repetibilidade procedeu-se à análise de 10 réplicas independentes dos padrões de maior e menor concentração, tabela 21, e determinou-se o desvio padrão da repetibilidade, **S**, e o coeficiente de variação, **CV**, para cada solução padrão, valores apresentados na tabela 22.

**Tabela 21.** Valores de absorvância obtidos na análise das 10 réplicas independentes do padrão 1 e 5.

<b>Ensaio</b>	<b>Padrão 1</b>	<b>Padrão 5</b>
<b>1</b>	0,659	0,239
<b>2</b>	0,663	0,213
<b>3</b>	0,666	0,225
<b>4</b>	0,650	0,227
<b>5</b>	0,655	0,212
<b>6</b>	0,663	0,275
<b>7</b>	0,642	0,225
<b>8</b>	0,663	0,234
<b>9</b>	0,645	0,235
<b>10</b>	0,634	0,223

**Tabela 22.** Dados obtidos no estudo da repetibilidade.

	<b>Padrão 1</b>	<b>Padrão 5</b>
<b>S<sub>r</sub></b>	0,0108	0,0178
<b>CV<sub>r</sub></b>	1,65	7,73

Para o estudo da precisão intermédia analisou-se duas soluções padrão, 1 e 5, em triplicado de 4 em 4 dias, e determinou-se o desvio padrão da precisão intermédia, **S<sub>r</sub>**, e o coeficiente de variação, **CV<sub>r</sub>**, para cada solução padrão, valores apresentados na tabela 23.

**Tabela 23.** Dados obtidos no estudo da precisão intermédia.

<b>Padrão</b>	<b>Dia</b>	<b>Absorvância</b>			<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV (%)</b>
1	1	0,616	0,594	0,594	0,013	2,112
	2	0,628	0,599	0,633	0,018	2,961
	3	0,686	0,689	0,688	0,002	0,222
	4	0,703	0,752	0,706	0,027	3,813
	5	0,675	0,686	0,672	0,007	1,088
	6	0,688	0,715	0,707	0,014	1,972
	7	0,715	0,703	0,689	0,013	1,853
	8	0,724	0,705	0,747	0,021	2,900
5	1	0,172	0,165	0,182	0,009	4,939
	2	0,187	0,178	0,174	0,007	3,706
	3	0,284	0,267	0,271	0,009	3,244
	4	0,266	0,261	0,265	0,003	1,002
	5	0,253	0,254	0,245	0,005	1,968
	6	0,248	0,249	0,265	0,010	3,756
	7	0,255	0,274	0,278	0,012	4,568
	8	0,227	0,232	0,211	0,011	4,912

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que os coeficientes de variação da repetibilidade são inferiores a 10%, assim como os coeficientes de variação da precisão intermédia, podendo assim afirmar que o método é preciso.

#### **4.2.7 EXATIDÃO**

A exatidão do método foi avaliada através de um ensaio de recuperação envolvendo três níveis de concentração e, para cada nível, efetuadas três réplicas. Na tabela 24 são apresentados os valores de absorvância obtidos para cada ensaio, assim como as taxas de recuperação e coeficientes de variação da exatidão.



**Tabela 24.** Valores obtidos no estudo da exatidão, os ensaios de recuperação.

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração de fortificação (mol/L)</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração obtida (mol/L)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	0,0000929	0,659	0,0000914	98,4	1,033
		0,650	0,0000901	97,0	
		0,663	0,0000920	99,0	
<b>2</b>	0,0000697	0,490	0,0000675	96,9	1,344
		0,497	0,0000685	98,3	
		0,503	0,0000694	99,5	
<b>3</b>	0,0000348	0,261	0,0000351	100,9	2,070
		0,255	0,0000343	98,4	
		0,251	0,0000337	96,8	

Com base nas taxas de recuperação obtidas, verifica-se que as mesmas se encontram dentro dos valores recomendados apresentados na tabela 2 apresentada no Capítulo “2.4.7 Exatidão”, entre 80 a 110%.

Para confirmar a exatidão do método, os valores médios das taxas de recuperação obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos ao Teste t, considerando o valor da taxa de recuperação ideal, 100%, como valor de referência. O valor de t de Student utilizado, com 95% de probabilidade e n-1 graus de liberdade foi de 4,303. Os valores obtidos para o Teste t são apresentados na tabela 25.

**Tabela 25.** Valores obtidos para o Teste t.

<b>Ensaio</b>	<b> t<sub>exp</sub> </b>	<b>t<sub>tab</sub></b>
<b>1</b>	3,076	
<b>2</b>	2,279	4,303
<b>3</b>	1,102	

Os valores experimentais de t são menores do que o valor tabelado, o que demonstra que o valor médio das taxas de recuperação não difere significativamente do valor de referência, podendo assim concluir que o método analítico é exato.

## b) COMPOSTO C

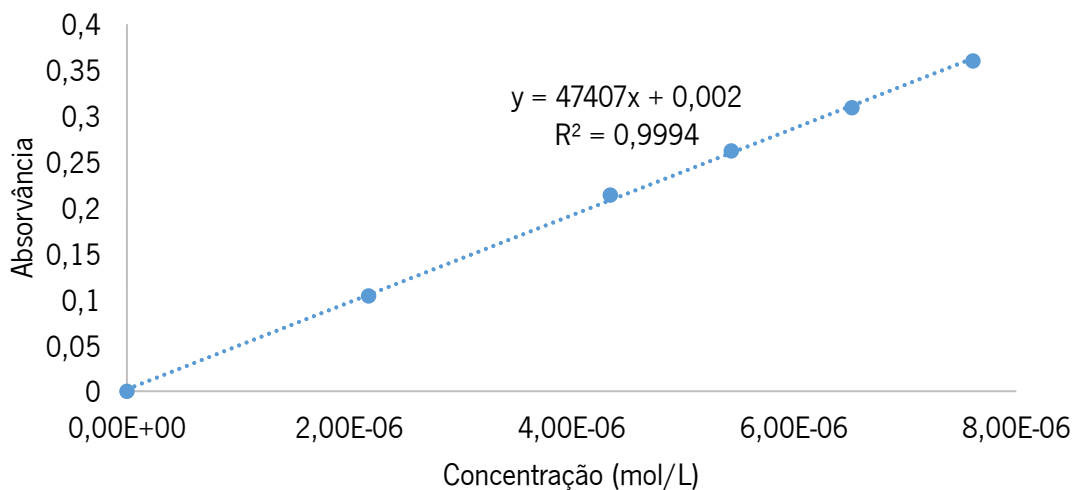
### 4.2.8 CALIBRAÇÃO

Para a construção da curva de calibração, analisou-se em separados as soluções padrão com o Composto C feitas a partir da solução mãe. Os valores obtidos são apresentados na tabela 26.

**Tabela 26.** Valores de absorvância medidos para cada solução padrão.

<b>Padrão</b>	<b>C (mol/L)</b>	<b>A (200 nm)</b>
<b>Branco</b>	0	0
<b>1</b>	$(7,6 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	0,360
<b>2</b>	$(6,5 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	0,309
<b>3</b>	$(5,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	0,262
<b>4</b>	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	0,214
<b>5</b>	$(2,17 \pm 0,09) \times 10^{-6}$	0,104

Na figura 28 é apresentada a curva de calibração obtida da relação linear entre as absorvâncias e as respectivas concentrações das soluções padrão, assim como a equação da respectiva reta e o valor do coeficiente de correlação.



**Figura 28.** Curva de calibração do Composto C.

A equação da reta pode ser reescrita tendo em conta as incertezas associadas ao declive ( $S_b$ ) e à ordenada na origem ( $S_a$ ):  $y = (b \pm t.S_b)x + (a \pm t.S_a)$

Mediante estes pressupostos a equação da reta final é:

$$y = (47407 \pm 1660)x + (0,002 \pm 0,008)$$

Posteriormente calculou-se o desvio padrão do método,  $S_m$ , e o coeficiente de variação do método,  $CV_m$ , valores apresentados na tabela 27.

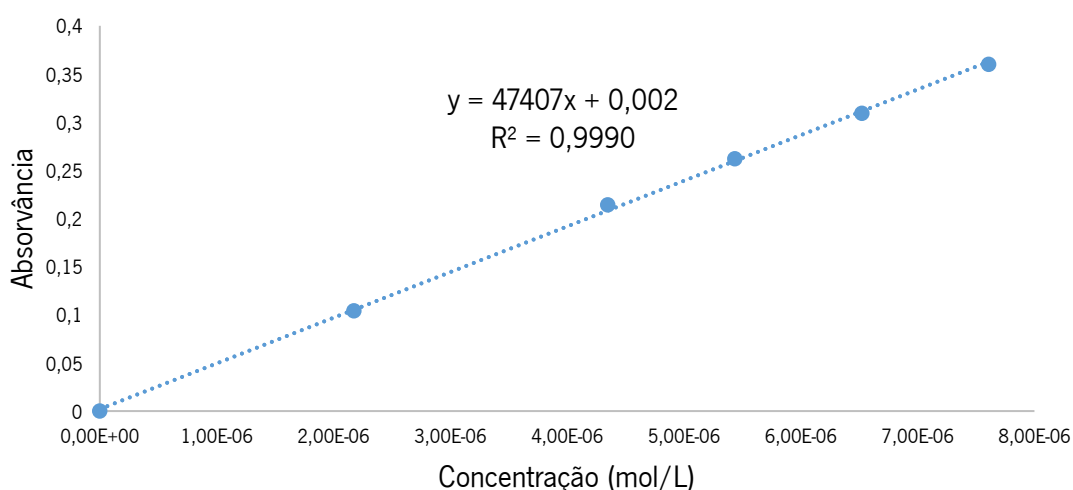
**Tabela 27.** Valores obtidos para o desvio padrão e coeficiente de variação do método

$S_m$	$CV_m$
$7,99 \times 10^8$	1,84 %

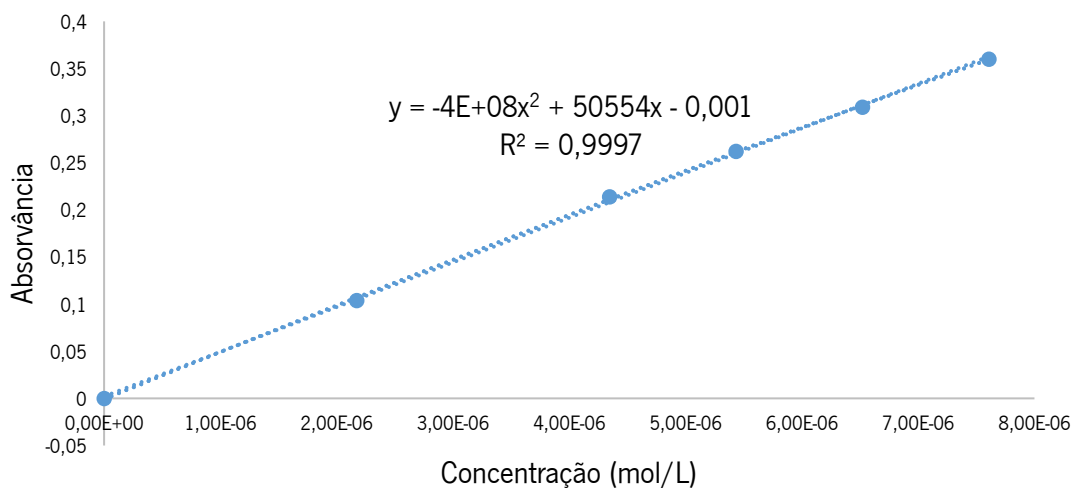
#### 4.2.9 LINEARIDADE

Para o estudo da linearidade da curva de calibração, inicialmente realizou-se uma análise visual, onde a mesma aparenta ter um bom ajuste linear e avaliou-se o coeficiente de correlação,  $R=0,999$ , que de acordo com o Guia Relacre13 representa uma boa correlação.

Numa segunda abordagem avaliou-se a linearidade através de um modelo estatístico, segundo a norma ISO 8466-1, onde foi calculada a função linear e a função não linear, figura 29 e 30, respetivamente.



**Figura 29.** Regressão linear do método.



**Figura 30.** Regressão polinomial do método.

Através das regressões foi possível calcular os respectivos desvios padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ , a diferença de variâncias,  $DS^2$ , e o valor PG, valores apresentados na tabela 28.

**Tabela 28.** Valores obtidos para o estudo da linearidade.

$S_{y/x}$	$S_{y^2}$	$DS^2$	PG	F
0,00379	0,00871	-0,000170	-2,24	864,2

O PG calculado é de -2,24 sendo inferior ao valor tabelado, o que permite concluir que a curva de calibração é linear.

# **CAPÍTULO 5**

Conclusão

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver e validar um método analítico para a quantificação do IR3535 presente em amostras têxteis tratadas com o produto Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish), produzido pela Smart Inovation®. A implementação deste método permite à empresa quantificar e validar a presença do composto IR3535 nas amostras têxteis antes destas seguirem para os testes de eficácia, de forma a garantir resultados positivos.

Numa primeira fase do trabalho procedeu-se a extração do IR3535 de amostras têxteis com diferentes solventes: o Acetonitrilo, o Etanol e o Isopropanol. Para cada solvente procedeu-se à quantificação do IR3535 e posteriormente calculou-se o rendimento de extração para cada solvente. Obteve-se um rendimento de 69, 28 e 0% na extração com Acetonitrilo, Etanol e Isopropanol, respetivamente. Desta fase de trabalho conclui-se que o melhor solvente para extrair o IR3535 seria o Acetonitrilo, pois foi aquele que obteve o rendimento mais elevado. Posto isto, procedeu-se à validação do método analítico apenas com o solvente Acetonitrilo.

Na segunda fase do trabalho efetuou-se a validação do método em dois processos. No primeiro processo procedeu-se validou-se os diferentes parâmetros, a Calibração da reta, Gama de trabalho, Linearidade, Limiões analíticos (Deteção e Quantificação), Sensibilidade, Precisão e Exatidão para o composto IR3535. No segundo processo, apenas realizou-se o estudo da Calibração da reta e da Linearidade para o Composto C. Isto acontece porque o principal objetivo deste trabalho é quantificar o composto IR3535 e não o Composto C.

Para o primeiro processo de validação, inicialmente realizou-se a calibração da equação da reta do IR3535, da qual resultou a equação da reta  $y = (7071 \pm 425)x + (0,01 \pm 0,03)$ .

No parâmetro gama de trabalho começou-se por definir a mesma, tendo-se verificado que estava bem ajustada, uma vez que o resultado do teste de homogeneidade de variâncias assim o indicou.

No estudo da linearidade, verificou-se através do coeficiente de correlação,  $R^2 = 0,998$ , e do modelo estatístico descrito na norma ISO 8466-1 que a função de calibração era linear.

No estudo dos limiões analíticos, verificou-se que o limite de deteção era de  $5,34 \times 10^6$  mol/L. Em relação ao limite de quantificação verificou-se que era de  $1,62 \times 10^5$  mol/L.

Na sensibilidade do método, esta corresponde ao declive da reta, que se mantém constante ao longo de toda a gama de trabalho, e tem o valor de 7071,9.

Para avaliar a precisão do método, realizou-se um estudo para a repetibilidade e um estudo para a precisão intermédia. Para ambos os estudos calcularam-se os coeficientes de variação, os quais são inferiores a 10%, o que permite concluir que o método é preciso.

No estudo da exatidão do método, realizou-se ensaios de recuperação nos quais se obteve taxas de recuperação entre os 96,8% e os 100,9%, valores estes que permitem concluir que o método é exato. Para confirmar esta conclusão realizou-se um Teste t, o qual permite mais uma vez confirmar a exatidão do método.

No segundo processo de validação, inicialmente realizou-se a calibração da equação da reta do Composto C, da qual resultou a equação da reta  $y = (47407 \pm 1660)x + (0,002 \pm 0,008)$ . No estudo da linearidade, verificou-se através do coeficiente de correlação,  $R^2 = 0,999$ , e do modelo estatístico descrito na norma ISO 8466-1 que a função de calibração era linear.

Por fim, conclui-se que o objetivo do trabalho foi atingido, pois a validação do método foi bem-sucedida.

## **5.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para um trabalho futuro, é sugerido que o método seja melhorado em vários aspectos fundamentais. Uma das alterações sugeridas é validar o mesmo método alterando apenas o método de quantificação para HPLC, como era a primeira abordagem do trabalho. Isto porque os componentes do produto Si Repel Mosquito® 101-TF (Textile Finish) têm comprimentos de onda máximos muito próximos, e por isso, ao uso do método de espectroscopia de UV-VIS na quantificação do IR3535 está associado um erro. Ao usar o HPLC, como os compostos têm tempos de retenção diferentes, seria possível isolar o IR3535 e quantificar o mesmo sem qualquer tipo de interferência dos outros compostos. Outro aspecto a melhorar seria o rendimento de extração, para tal, é sugerido realizar a extração com outro tipo de solventes ou então usar outro tipo de extração, como por exemplo, a extração por Soxhlet.



# **BIBLIOGRAFIA**

1. Benelli, G. "Research in mosquito control: current challenges for a brighter future". *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26, 921-929. 2019.
2. WHO. "A global brief on vector-borne diseases". *World Health Organization*. 2014.
3. Tavares, M. Tavares, M., Silva, M., Siqueira, L. *et al.* "Trends in insect repellent formulations: A review". *International Journal of Pharmaceutics*. 539, 190-209. 2018.
4. Benelli, G. "Managing mosquitoes and ticks in a rapidly changing world – Facts and trends". *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26, 921-929. 2019.
5. Norris, E. and Coats, J. "Current and future repellent technologies: The potential of spatial repellents and their place in mosquito-borne disease control". *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14, 1-15. 2017.
6. Reichert, W., Ejercito, J. and Guda, T. "Repellency Assessment of *Nepeta cataria* Essential Oils and Isolated Nepetalactones on *Aedes aegypti*". *Scientific Reports*. 9, 1-15. 2019.
7. Afonso, C. "Conceção de uma estrutura têxtil multifuncional para a profilaxia de patologias ulcerosas no pé de pacientes diabéticos". Tese de Mestrado em Engenharia Têxtil. Faculdade de Engenharia, Universidade da Beira Interior. Covilhã. 2009.
8. Marques, M. "Acabamentos químicos em tecidos". Tese de Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química. Escola de Ciências, Universidade do Minho. Braga. 2015.
9. Almeida, L. "Functionalisation of textiles: future perspectives". *Congrés International de la Recherche Appliqueé aux Textiles*. Monastir, Túnisia. 2006.
10. Carmo, S. "Acabamentos Funcionais Têxteis Aplicados por Estamparia Digital em Substratos Têxteis Ativados por Plasma". Tese de Doutoramento em Engenharia Têxtil. Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga. 2016.
11. Paul, R. "Functional Finishes for Textiles: an overview". Woodhead Publishing. Reino Unido. 2015.
12. Riaz, S., Ashraf, M., Hussain, T. *et al.* "Functional finishing and coloration of textiles with nanomaterials". *Society of duers and colourists*. 134, 327-347. 2018.
13. Islam, S. U. and Butola, D. S. "Nanomaterials in the Wet Processing of Textiles. Nanomaterials in the Wet Processing of Textiles". Scrivener Publishing. Austin, Texas. 2018.
14. Shabbir, M., Ahmed, S. and Sheikh, J. N. "Frontiers of Textile Materials: Polymers, Nanomaterials, Enzymes and Advanced Modification Techniques". Scrivener Publishing. Austin, Texas. 2020.
15. Paluch, G. E. and Coats, J. R. "Recent Developments in Invertebrate Repellents". American Chemical Society. Washington. 2011.

16. Rodil, R. and Moeder, M. "Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples." *Journal of Chromatography A*. 1178, 9-16. 2008.
17. Bissinger, B. W. and Roe, R. M. "Tick repellents: Past, present, and future". *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 96, 63-79. 2010.
18. Bohbot, J. D., Strickman, D. and Zwiebel, L. J. "The future of insect repellent discovery and development". *Outlooks on Pest Management*. 25, 265-270. 2014.
19. Lupi, E., Hatz, C. and Schlagenhauf, P. "The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - A literature review". *Travel Medicine Infectious Disease*. 11, 374-411. 2013.
20. Brown, M. and Hebert, A. A. "Insect repellents: An overview". *Journal of American Academy Dermatology*. 36, 243-249. 1997.
21. Katz, T. M., Miller, J. H. and Hebert, A. A. "Insect repellents: Historical perspectives and new developments". *Journal of the American Academy Dermatology*. 58, 865-871. 2008.
22. Fradin, M. S. and Day, J. F. "Comparative Efficacy of Insect Repellents Against Mosquitoes". *New England Journal of Medicine*. 347, 13-18. 2002.
23. Broschard, T. H., Bohlmann, A. M., Konietzny, S., *et al.* "Biotransformation and toxicokinetics of the insect repellent IR3535® in male and female human subjects after dermal exposure". *Toxicology Letters*. 218, 246-252. 2013.
24. Iyigundogdu, Z., Kalayci, S., Asutay, A. B. *et al.* "Determination of antimicrobial and antiviral properties of IR3535". *Molecular Biology Reports*. 46, 1819-1824. 2019.
25. Regulation (EU) No 528/2012. "Product Assessment Report of a Biocidal Product for National Authorisation". European Chemicals Agency. Helsinki, Finland. 2019.
26. Carroll, S. P. "Prolonged efficacy of IR3535 repellents against mosquitoes and blacklegged ticks in North America". *Journal of Medical Entomology*. 45, 706-714. 2008.
27. Debboun, M., Frances, S. P. and Strickman, D. "Insect Repellents: Principles, Methods and Uses". 1st Edition. CRC Press. Boca Raton, Florida. 2006.
28. Discover everything about our insect repellent IR3535® | Merck Global.  
<https://www.merckgroup.com/en/expertise/cosmetics/care-solutions/insect-repellent/about-IR3535.html>. Visitado em 06/02/2021.
29. Fonatana, A. R., Antonioli, A. and Bottini, R. "Development of a Simple Hplc Method Using Core-Shell Particles Column for Quantification of Ir3535® in Insect Repellent Liquid Formulations". *Food Chemistry*. 192, 1-8. 2016.
30. Nitchanpansri, J., Nakniyom, W., Meethong, S. *et al.* "Determination of Insect Repellents by HPLC". Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2006.

31. Vilar, W. T. S. "Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em HPLC-DAD, espectroscopia no infravermelho e quimiometria para o controle de qualidade de repelente de insetos". Tese de Doutorado em Química. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba. 2018.
32. Silva, D. I. O., Vilar, W. T. S. and Pontes, M. J. C. "Chemometric-assisted UV spectrophotometric method for determination of N, N- diethyl-3-methylbenzamide in insect repellents". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 241, 1-6. 2020.
33. Silva, D. I. de O. "Uma metodologia baseada em espectrometria UV-VIS e quimiometria para a determinação de n,n-dietil-3-metilbenzamida em repelentes". Tese de Mestrado em Química. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba. 2018.
34. Skoog, D. A., Holler, F. J. and Crouch, C. R. "Principles of Instrumental Analysis". 6th Edition. Thomson Brooks/Cole. Belmont, Califórnia. 2007.
35. Martinho, J. M. G. "Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível". *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 52, 44-46. 1994.
36. Owen, T. "Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy: A Primer". Hewlett-Packard. Germany. 1996.
37. Paiva, D. L., Lampman, G. M. and Kriz, G. S. "Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry". 3th Edition. Thomson Brooks/Cole. Bellingham, Washington. 2001
38. Soares, P. "Análise da durabilidade e estabilidade dos princípios ativos presentes em substratos com propriedades de repelência a mosquitos". Tese de Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química. Escola de Ciências, Universidade do Minho. Braga. 2016.
39. Harris, D. C. "Quantitative Chemical Analysis". 8th Edition. W. H. Freeman and Company. New York. 2015.
40. Brito, N. M., Junior, O. P. A. J., Polese, L. *et al.* "Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão". *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 13, 129-146. 2003.
41. Magnusson, B. and Örnemark, U. "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". 2nd edition. 2014.
42. Augusto, C. and Cabrita, L. "Guia RELACRE 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química". Relacre. 2000.
43. Costa, R. "Validação de métodos na análise química de laticínios". Tese de Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Porto. 2017.

44. Forte, M. "Desenvolvimento de métodos analíticos para controlo de qualidade de resinas naturais". Tese de Mestrado em Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química. Escola de Ciências, Universidade do Minho. Braga. 2015.
45. ISO 8466-1. "Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function". International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 1990.
46. ISO 8466-2. "Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions". International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 2001
47. Gonçalves, G. "Desenvolvimento e validação de um método de geração de partículas de referência para calibração de contadores óticos". Mestrado em Química Tecnológica. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa. 2019.
48. Ribeiro, V. "Controlo da qualidade e validação de métodos cromatográficos - da teoria à prática". Mestrado em Química. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra. 2015.
49. Faulde, M. K., Albiez, G. and Nehring, O. "Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique". Parasitology Research. 106, 957–965. 2010.
50. Martins, C. R., Lopes, W. A. and Andrade, J. B. "Solubilidade das substâncias orgânicas". Química Nova. 36, 1248-1255. 2013.
51. Miller, J. N. and Miller, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 5th Edition. Pearson Education Limited. England. 2005.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1 – VALORES DE T DE STUDENT, PARA 95% DE PROBABILIDADE<sup>51</sup>

Value of $t$ for a confidence interval of Critical value of $ t $ for $P$ values of number of degrees of freedom	90% 0.10	95% 0.05	98% 0.02	99% 0.01
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
$\infty$	1.64	1.96	2.33	2.58

The critical values of  $|t|$  are appropriate for a *two-tailed* test. For a *one-tailed* test the value is taken from the column for *twice* the desired  $P$ -value, e.g. for a one-tailed test,  $P = 0.05$ , 5 degrees of freedom, the critical value is read from the  $P = 0.10$  column and is equal to 2.02.

## ANEXO 2 – VALORES DE DISTRIBUIÇÃO F DE SNEDECOR, PARA 95% DE PROBABILIDADE<sup>51</sup>

v <sub>2</sub>	v <sub>1</sub>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

v<sub>1</sub> = number of degrees of freedom of the numerator; v<sub>2</sub> = number of degrees of freedom of the denominator.



### **ANEXO 3 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DO IR3535 NAS AMOSTRAS APÓS A EXTRAÇÃO**

1 g de tecido – 0,0171 g de IR3535

0,5 g de tecido – X

X = 0,00855 g de IR3535

M(IR3535) = 215,29 g/mol

$$n = \frac{m}{M} = \frac{0,00855}{215,29} = 0,0000397 \text{ mol de IR3535 em 0,5 g de tecido}$$

Considerando um rendimento de 100% e um volume final de extração igual a 0,05L, temos uma concentração:

$$C = \frac{n}{V} = \frac{0,0000397}{0,05} = 7,9 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

## ANEXO 4 – CÁLCULOS INTERMÉDIOS USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### a) IR3535

#### Calibração

**Tabela 29.** Cálculo do desvio padrão residual,  $S_{y/x}$ .

$x_i$	$y_i$	$\hat{y}_i$	<b>a</b>	<b>b</b>	$\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$	<b>N-2</b>	<b><math>S_{y/x}</math></b>
0	0	0,013					
$9,3 \times 10^5$	0,659	0,669					
$8,1 \times 10^5$	0,586	0,587	0,0125	7071,9	0,0005234	4	0,01144
$5,8 \times 10^5$	0,432	0,423					
$4,6 \times 10^5$	0,343	0,341					
$3,5 \times 10^5$	0,272	0,259					

**Tabela 30.** Cálculo da incerteza associado ao declive da reta,  $S_b \cdot t$ .

<b><math>S_{y/x}</math></b>	$x_i$	$\bar{x}_i$	$\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$	<b><math>S_b</math></b>	<b>t</b>	<b><math>S_b \cdot t</math></b>
	0					
	$9,3 \times 10^5$					
0,01144	$8,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	152,9	2,780	425,10
	$5,8 \times 10^5$					
	$4,6 \times 10^5$					
	$3,5 \times 10^5$					

**Tabela 31.** Cálculo da incerteza associado à ordenada de origem da reta, Sa.t.

$S_{y/x}$	$x_i$	$\bar{x}_i$	$\sum_{i=1}^N (x_i)^2$	$N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$	$S_s$	$t$	$S_s \cdot t$
	0							
	$9,3 \times 10^5$							
0,01144	$8,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$7,5 \times 10^5$	0,00926	2,780	0,0257
	$5,8 \times 10^5$							
	$4,6 \times 10^5$							
	$3,5 \times 10^5$							

**Tabela 32.** Cálculo da incerteza associada à concentração do analito na amostra, Sx0.

$S_{y/x}$	$b$	$N$	$n$	$(\bar{y}_0 - \bar{y})^2$	$x_i$	$\bar{x}_i$	$b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$	$S_{x_0}$	$t$	$S_{x_0} \cdot t$
					0					
					$9,3 \times 10^5$					
0,0114	7071,9	6	3	12,43	$8,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$	0,00926	2,780	0,0257
					$5,8 \times 10^5$					
					$4,6 \times 10^5$					
					$3,5 \times 10^5$					

**Tabela 33.** Cálculo do desvio padrão do método, Sm.

$S_{y/x}$	$b$	$S_m$
0,01143	7071,9	$1,62 \times 10^{-6}$

**Tabela 34.** Cálculo de coeficiente de variação do método, CVm.

$S_m$	$x_i$	$\bar{x}_i$	$CV_m$
	0		
	$9,3 \times 10^5$		
$1,62 \times 10^{-6}$	$8,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	3,10 %
	$5,8 \times 10^5$		
	$4,6 \times 10^5$		
	$3,5 \times 10^5$		

## Gama de trabalho

**Tabela 35.** Cálculo do desvio padrão da gama de trabalho.

Ensaio	Padrão 1	Padrão 5
<b>1</b>	0,659	0,239
<b>2</b>	0,663	0,213
<b>3</b>	0,666	0,225
<b>4</b>	0,650	0,227
<b>5</b>	0,655	0,212
<b>6</b>	0,663	0,275
<b>7</b>	0,642	0,225
<b>8</b>	0,663	0,234
<b>9</b>	0,645	0,235
<b>10</b>	0,634	0,223
<b>Média</b>	0,654	0,231
<b>S<sup>2</sup></b>	0,000117	0,000318

$$S^2_5 > S^2_1, \text{ então } PG = \frac{S^2_7}{S^2_1} \Leftrightarrow PG = \frac{0,000318}{0,000117} \Leftrightarrow PG = 2,715$$

## Linearidade

**Tabela 36.** Cálculo da diferença entre variâncias, DS, e o valor de PG.

y	$\hat{y}$	$\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$	N	S <sub>y2</sub>	DS <sup>2</sup>	PG	F
0	0,001						
0,659	0,661						
0,586	0,587						
0,432	0,432	0,00008744	6	0,0054	0,000436	14,9	864,2
0,343	0,350						
0,272	0,266						

## b) Composto C

### Calibração

**Tabela 37.** Cálculo do desvio padrão residual,  $S_{y/x}$

$x_i$	$y_i$	$\hat{y}_i$	<b>a</b>	<b>b</b>	$\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$	<b>N-2</b>	<b><math>S_{y/x}</math></b>
0	0	0,002					
$7,6 \times 10^6$	0,360	0,363					
$6,5 \times 10^6$	0,309	0,311	0,002	47407	$5,7 \times 10^5$	4	0,003785
$5,4 \times 10^6$	0,262	0,260					
$4,4 \times 10^6$	0,214	0,208					
$2,2 \times 10^6$	0,104	0,105					

**Tabela 38.** Cálculo da incerteza associado ao declive da reta,  $S_{b,t}$ .

<b><math>S_{y/x}</math></b>	$x_i$	$\bar{x}_i$	$\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$	<b><math>S_b</math></b>	<b>t</b>	<b><math>S_{b,t}</math></b>
	0					
	$7,6 \times 10^6$					
0,003785	$6,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	597,3	2,780	1660,4
	$5,4 \times 10^6$					
	$4,4 \times 10^6$					
	$2,2 \times 10^6$					

**Tabela 39.** Cálculo da incerteza associado à ordenada de origem da reta,  $S_{a,t}$ .

<b><math>S_{y/x}</math></b>	$x_i$	$\bar{x}_i$	$\sum_{i=1}^N (x_i)^2$	$N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$	<b><math>S_a</math></b>	<b>t</b>	<b><math>S_{a,t}</math></b>
	0							
	$7,6 \times 10^6$							
0,003785	$6,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$	0,798	0,00302	2,780	0,00840
	$5,4 \times 10^6$							
	$4,4 \times 10^6$							
	$2,2 \times 10^6$							

**Tabela 40.** Cálculo do desvio padrão do método, Sm.

$S_{y/x}$	<b>b</b>	$S_m$
0,003785	47407	$7,9 \times 10^{-8}$

**Tabela 41.** Cálculo de coeficiente de variação do método, CVm.

$S_m$	$x_i$	$\bar{x}_i$	<b>CV<sub>m</sub></b>
	0		
	$7,6 \times 10^{-6}$		
$7,9 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	1,84 %
	$5,4 \times 10^{-6}$		
	$4,4 \times 10^{-6}$		
	$2,2 \times 10^{-6}$		

### Linearidade

**Tabela 42.** Cálculo da diferença entre variâncias, DS, e o valor de PG.

<b>y</b>	$\hat{y}$	$\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$	<b>N</b>	$S_{y_2}$	<b>DS<sup>2</sup></b>	<b>PG</b>	<b>F</b>
0	-0,001						
0,36	0,351						
0,309	0,303	0,0002276	6	0,00871	-0,000170	-2,24	864,2
0,262	0,255						
0,214	0,206						
0,104	0,105						