

Artigo

Avaliação de Métodos Espectrofotométricos para a Determinação de Proteínas em Polissacarídeo Capsular de *Haemophilus influenzae* Tipo b (PRP)

Lemos, I. A.;* Silva Júnior, J. G.; Spisso, B. F.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (6), 2625-2641. Data de publicação na Web: 16 de novembro de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

Evaluation of Spectrophotometric Methods for Determination of Proteins in Capsular Polysaccharide of *Haemophilus influenzae* Type b (PRP)

Abstract: *Haemophilus influenzae* type b (Hib) bacteria that occur worldwide can cause serious infectious diseases that may lead to death. Vaccines made from Hib capsular polysaccharide (polyribosyl ribitol phosphate; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-phosphate; PRP) can prevent against these diseases. In PRP purification, the major contaminants (nucleic acids, proteins and endotoxins) are selectively removed and the classic Lowry method has been used in quality control for protein quantification, but has been shown to be inadequate for the level of this impurity found in PRP. This work aimed to select a suitable spectrophotometric method for the determination of residual protein levels in PRP samples. The results indicated the superiority of the Peterson method, with sensitivity of 0.01 μg mL⁻¹, quantification limits of 0.5 μg mL⁻¹, precision of 5.0% and accuracy of 97%.

Keywords: Protein quantification; Peterson method; Lowry method; Smith method.

Resumo

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), que ocorre no mundo inteiro, é capaz de provocar doenças infecciosas severas que podem levar à morte. As vacinas feitas a partir do polissacarídeo capsular de Hib (polirribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP) são usadas na prevenção de doenças meningocócicas. Na etapa de purificação do PRP os principais contaminantes (ácidos nucleicos, proteínas e endotoxinas) são removidos seletivamente e o clássico método Lowry é usado no controle da qualidade para quantificação de proteínas, mas demonstrou ser inadequado para o nível desta impureza no PRP. Este trabalho teve como objetivo sugerir um método espectrofotométrico mais apropriado para a determinação de proteínas à nível residual em amostras de PRP. Os resultados indicaram a superioridade do método Peterson, com sensibilidade de 0,01 μg mL⁻¹, limites de quantificação de 0,5 μg mL⁻¹, precisão de 5,0 % e acurácia de 97%.

Palavras-chave: Quantificação de proteínas; Método Lowry; Método Peterson; Método Smith.

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Tecnológico de Imunobiológicos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

 i.lemos.azevedo@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20170153](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170153)

Avaliação de Métodos Espectrofotométricos para a Determinação de Proteínas em Polissacarídeo Capsular de *Haemophilus influenzae* Tipo b (PRP)

Izabel A. de Lemos,^{a,*} José G. da Silva Júnior,^a Bernardete F. Spisso^b

^a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Tecnológico de Imunobiológicos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, CEP 21045-900, Rio de Janeiro- RJ, Brasil

* i.lemos.azevedo@gmail.com

Recebido em 6 de setembro de 2017. Aceito para publicação em 14 de novembro de 2017

1. Introdução

- 1.1. Métodos espectrofotométricos para determinação de proteínas totais
- 1.2. Potenciais interferentes analíticos na determinação de proteínas em PRP e a escolha do método analítico

2. Método

- 2.1. Materiais e equipamentos
- 2.2. Procedimentos

3. Resultados e discussão

- 3.1. Solubilidade
- 3.2. Precisão na determinação da concentração de proteínas nas amostras de PRP empregando os métodos Lowry, Peterson e Smith
- 3.3. Sensibilidade
- 3.4. Comparação entre os métodos Lowry e Peterson
- 3.5. Avaliação do método escolhido em condições de rotina

4. Conclusão

1. Introdução

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), que ocorre no mundo inteiro é capaz de provocar doenças infecciosas severas em crianças podendo levar à morte. Vacinas

feitas a partir do polissacarídeo capsular de Hib (polirribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP), podem prevenir contra doenças meningocócicas, principalmente em países com recursos limitados, nos quais a vacinação é a alternativa mais eficaz e acessível.¹ No Brasil, após a primeira imunização contra meningite

tipo b, registrou-se em 1999 uma redução superior a 90% no número de casos, incidência e óbitos.²

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a priorização da garantia da qualidade na produção e desenvolvimento de produtos eficazes e seguros, e especificamente no caso de vacinas, isto é ainda mais relevante, pois são medicamentos direcionados aos indivíduos saudáveis visando a prevenção de doenças.³

Métodos analíticos adequados são fundamentais para garantir a qualidade do produto final.⁵ Segundo a OMS, a maioria dos ensaios para liberação dos lotes das vacinas conjugadas de *H. influenzae* tipo b enfatizam a pureza e a caracterização molecular das vacinas usadas em testes clínicos. Os testes rotineiros do controle de qualidade são baseados em critérios físico-químicos para monitoramento da qualidade dos polissacarídeos, da proteína carreadora e dos *bulks* conjugados.¹ Vale ressaltar que o conteúdo de proteína nas preparações vacinais de PRP deve ser menor que 1%, calculado em relação à massa seca da substância, utilizando-se albumina do soro bovino (BSA) como referência.⁴

Os métodos espectrofotométricos utilizando albumina do soro bovino (BSA) como referência são os mais usados para determinação de proteínas, visto ser impraticável na rotina laboratorial o uso de procedimentos analíticos demorados e caros, como a análise de aminoácidos.^{6,7}

1.1. Métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais

O método Lowry et al tem sido o mais utilizado devido à sua simplicidade, rapidez e custo.^{8,9} Neste método, a amostra é tratada com uma solução alcalina de cobre e em seguida com o cromógeno misto de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico ($3 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13 \text{ WO}_3 \cdot 5 \text{ MoO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ e $3 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14 \text{ WO}_3 \cdot 4 \text{ MoO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$). Nesta segunda etapa, a cor é desenvolvida em decorrência da

redução rápida do reagente fenólico pelos resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano e de uma reação lenta do quelato de cobre com a cadeia peptídica, obtendo-se um heteropoliácido azul com absorção máxima a 750 nm .⁹ Este método apresenta limite de detecção inferior a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e demonstra baixa variabilidade com diferentes proteínas.¹⁰

O método Peterson é uma variação do método Lowry, cujas principais alterações são o aumento das concentrações dos reagentes e a adição de dodecilsulfato de sódio (SDS). Apresenta a vantagem de solubilizar melhor amostras contendo membranas celulares, sendo aplicável à amostras em baixas concentrações (1 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e também demonstra baixa variabilidade entre diferentes proteínas.^{7-9,11}

O método Smith tem como vantagens em relação ao método Lowry maior rapidez e o uso de menor quantidade de amostra, mas é incompatível com agentes redutores e necessita de incubação acima de 37°C . A coloração é produzida pela reação em meio alcalino entre duas moléculas do ácido bicinonínico (BCA) e um íon cobre, com a redução do íon Cu^{2+} pelas proteínas. Quanto à sua sensibilidade, Johnson e Zaia concordam que o método é equivalente ao método Lowry, sendo capaz de detectar concentrações de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, Wilson e Walker diferentemente, consideram-no muito mais sensível, mas sem explicitar a que concentrações se referem para essa conclusão.^{8,10,12-14}

O método Bradford é baseado na ligação do corante azul de Coomassie brilhante G-250 (CBBG) às proteínas, sendo capaz de detectar concentrações de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tem como vantagens a rapidez, o custo, a estabilidade e a compatibilidade com agentes redutores, mas apresenta resposta anômala para peptídeos de massa molar baixa (<67.000 uma). É indicado principalmente para amostras contendo resíduos de arginina, lisina e histidina.¹⁴⁻¹⁶

O método de absorção no ultravioleta (UV) é rápido e não destrutivo, no entanto a

baixa especificidade é sua principal desvantagem, pois diversas outras substâncias absorvem no UV. Não obstante, é menos sensível que os métodos Lowry, Smith e Bradford.^{10,16}

O método Biureto tem sido utilizado desde 1915, é considerado rápido e de baixo custo.¹⁴ Devido à sua simplicidade e exatidão é um dos mais empregados na determinação de proteínas totais.¹⁷ É aplicável a amostras contendo altas concentrações de proteínas (2 a 10%). A absorvância máxima do cromóforo ocorre a 540 nm, dada pela reação dos íons cúpricos com as proteínas.¹⁸ Segundo Lowry et al, sua maior vantagem é a baixíssima variabilidade entre diferentes proteínas, mas demonstra baixa sensibilidade.⁸

1.2. Potenciais interferentes analíticos na determinação de proteínas em PRP e a escolha do método analítico

O conhecimento dos processos de purificação do PRP e da fabricação das vacinas Hib é fundamental para que se possa identificar possíveis interferentes na quantificação das proteínas. Estudos de Schneerson et al e Argaman et al apud Crisel et al contribuíram para a elucidação da estrutura do PRP (Figura 1) e do caráter não redutor na determinação das proporções de ribose, ribitol e fosfato. Atualmente sabe-se que o PRP é um polímero linear composto de unidades de (poliribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP), conforme descrito por Crisel et al.^{19-21,24}

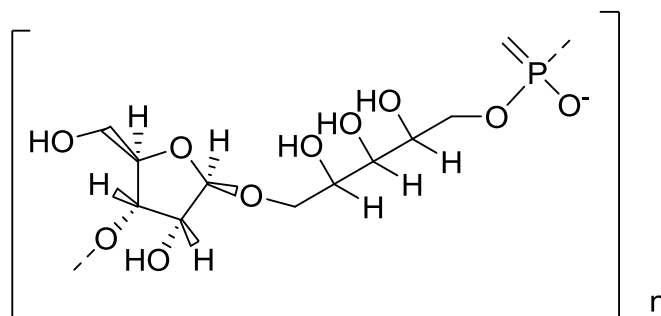


Figura 1. Estrutura química do PRP (Adaptado de MARTINEAU et al, 2015).

Verificou-se que a molécula íntegra do PRP conforme descrito por Martineau et al, não caracteriza o efeito redutor da ribose, mas no caso de biopolímeros, condições brandas, como o uso da temperatura de 60°C para secagem das amostras podem desencadear reações químicas e gerar produtos de degradação.²²⁻²⁴

De fato, um estudo sobre a avaliação do efeito da temperatura sobre o conteúdo de PRP demonstrou que temperaturas acima de 37 °C interferiram nos resultados.¹

Na primeira etapa da produção da vacina conjugada contra Hib - a purificação do PRP - os principais contaminantes, ácidos nucleicos, proteínas e endotoxinas, são removidos seletivamente por processo cromatográfico, seguido de ultrafiltração,

diálise e liofilização, a fim de se obter um produto de alta massa molar e significativa atividade imunogênica.^{19,20,24}

Segundo Wilson e Walker, é necessário avaliar precisão, limite de detecção, acurácia, custo e a disponibilidade de equipamentos na seleção do método analítico. Neste trabalho, foram também considerados o tempo de análise, a quantidade de amostra requerida para análise e a compatibilidade da amostra com os métodos testados, um dos aspectos mais difíceis na determinação da concentração de proteínas segundo Olson e Markwell.^{10,16}

Os métodos Peterson e Smith foram selecionados para comparação com o método Lowry. Os parâmetros avaliados, conforme recomendação de publicações

oficiais específicas e gerais para a validação de métodos analíticos.²⁵⁻²⁸

2. Método

Foi realizada uma avaliação experimental comparativa dos métodos espectrofotométricos de Peterson, Smith e Lowry.

Os parâmetros seletividade, efeito matriz, intervalo de medição; intervalo linear, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, acurácia (recuperação) e precisão (repetibilidade) foram avaliados segundo as orientações específicas nacionais,^{5,25-27} internacionais e genéricas.^{3,23,28}

Foi aplicado um intervalo que permitiu realizar a comparação entre os três métodos, utilizando padrões de BSA em seis níveis distintos de concentrações. Para o Lowry (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Peterson (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Smith (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 25,0 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Adotou-se para definição do menor nível da curva, o critério empregado para métodos bioanalíticos (desvio padrão relativo, $\text{RSD} \leq 15\%$) e não o recomendado como critério geral para métodos analíticos (LQ como o menor nível da curva),^{5, 25,28} visto que os LD e LQ teóricos dos métodos são diferentes. Consequentemente, a concentração mais esperada não ficou situada exatamente na região central do intervalo proposto.

O fator de matriz (FM) foi determinado pela razão da resposta do analito em matriz e a resposta do analito em solução para o método Lowry (2,5 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Peterson (1,0 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pela aplicação do teste de Cochran ($n = 3$; $l = 6$), do teste F e do teste t, conforme recomendado pelo Inmetro.^{27,33}

O LD e o LQ foram calculados a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo y obtidos de 3 curvas de calibração no intervalo contendo concentrações do analito na quantidade mais esperada para a

impureza até a menor concentração do analito que foi determinada com precisão e exatidão adequadas. A precisão foi avaliada calculando-se o RSD das concentrações das leituras de absorvância das amostras e de cada nível de concentração pela fórmula $\text{RSD} = s / \bar{x} (100)$, onde s é o desvio padrão e \bar{x} a média das leituras das amostras; a acurácia (recuperação) foi determinada estatisticamente pela diferença entre as médias dos valores obtidos no intervalo 2,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, comparando-se com o valor teórico do analito (BSA).

2.1. Materiais e equipamentos

As amostras de PRP utilizadas nos experimentos foram fornecidas pelo Departamento de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos/Fiocruz. Os materiais e equipamentos utilizados são descritos a seguir.

Albumina de Soro Bovino (BSA) 2,0 mg mL^{-1} (nº catálogo 23209, Thermo Fisher Scientific, EUA); Reagente de fenol Folin-Ciocalteu 2 N (Merck, Alemanha); hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (Merck, Alemanha); hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1} (Merck, Alemanha); sulfato de cobre (II) penta hidratado P.A. (Merck, Alemanha); tartarato de sódio e potássio P.A. (Merck, Alemanha); carbonato de sódio P.A. (Merck, Alemanha); dodecil sulfato de sódio (SDS) P.A. (Merck, Japão); desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha); kit *bicinchoninic acid protein assay* (nº catálogo BCA-1, Sigma-Aldrich, Alemanha) e água ultrapura tipo 1. Espectrofotômetro de absorção molecular UV-Visível Cary 60, método 5.0.0.999 (Agilent, EUA); cubetas de quartzo de 10 mm, 1,4 mL e 0,5 mL (Thomas Scientific, EUA); analisador de umidade MA100 (Sartorius, Alemanha); balança analítica CP225D (Sartorius, Alemanha); pipetas automáticas de volume variável, 10-100 μL , 100-1000 μL e 500-5000 μL (Eppendorf, EUA); ponteiras descartáveis, 100-5000 μL , 50-1000 μL e 2-200 μL (Eppendorf, EUA); sistema de obtenção de água ultrapura tipo 1, Milli-Q

Direct (Millipore, EUA); balões volumétricos calibrados, 10 mL e 20 mL; agitador magnético M-41 (Yamata, Japão); agitador de tubos IKA MS3 (Sigma, Alemanha); banho ultratermostatizado NTT-211 (EYELA, Japão); tubos de ensaio de vidro com tampa 10 x 100 mm; tubos de vidro 5 x 70 mm; tubos descartáveis de polipropileno com tampa (Eppendorf, EUA); câmara fria no intervalo entre 2-8 °C; termômetro calibrado 10-110°C; tubos 15 mL de polipropileno para centrífuga; *vials* 1,5 mL descartáveis de vidro e de polipropileno (Waters, EUA); *vials* 5,0 mL de polipropileno (ThermoFisher Scientific, EUA); frascos de vidro e de polipropileno com tampa.

2.2. Procedimentos

As curvas de calibração de BSA foram preparadas no intervalo de 2,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mas no caso do método Smith, como não se tinha uma definição teórica de seus limites de quantificação foi usado também o intervalo de 5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a fim de atender ao preconizado para intervalo de trabalho e intervalo linear na quantificação de impurezas (no caso proteínas), considerando a quantidade mais esperada (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e não o limite regulatório^{4, 23} de 1% da impureza no PRP (equivalente a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).^{4, 23, 28}

Para a solubilização das amostras e soluções padrão de trabalho de BSA (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) avaliou-se a substituição da água à temperatura ambiente por água resfriada a aproximadamente 4°C, bem como por solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ contendo 2% de SDS.

Os métodos Lowry, Peterson e Smith foram executados conforme descrito a seguir. Todas as soluções foram preparadas e homogeneizadas imediatamente no momento do uso.

Método Lowry

O método foi executado conforme descrito por Lowry et al, utilizando-se as soluções de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹; sulfato de cobre 1%; tartarato de sódio e potássio 2%; solução contendo 2% de carbonato de sódio, 0,01% de sulfato de cobre e 0,02% de tartarato de potássio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e o reagente de fenol Folin-Ciocalteau diluído na proporção de 1:1 (v/v) em água ultrapura tipo 1.⁸

As curvas de calibração foram preparadas em tubos de ensaio 10 x 100 mm, usando alíquotas de 400 μL e em triplicata para cada um dos níveis de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Método Peterson

O método descrito por Peterson foi aplicado utilizando-se 100 mL de uma solução de cobre – tartarato – carbonato (CTC) contendo 10% de carbonato de sódio, 0,1% de sulfato de cobre penta hidratado e 0,2% de tartarato de potássio (preparada com 50 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20%, 0,1 g de sulfato de cobre penta hidratado e 0,2 g de tartarato de sódio e potássio diluídos em água ultrapura tipo 1); 20 mL de uma solução de SDS a 5%; 10 mL de hidróxido de sódio 0,8 mol L⁻¹ (8,0 mL de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ em 2 mL de água ultrapura tipo 1); solução A (10 mL da solução CTC, 10 mL de hidróxido de sódio 0,8 mol L⁻¹ e 20 mL de SDS 5% misturados em frasco de polipropileno sob agitação) e uma solução 1:5 (v/v) do reagente de Folin-Ciocalteau (4 mL do reagente de Folin-Ciocalteau diluído com 20 mL de água ultrapura tipo 1).⁷ As curvas de calibração foram preparadas nas mesmas concentrações e número de alíquotas descritas para o método Lowry.

Método Smith

Para execução do método Smith, utilizou-se o Kit *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (Sigma, Alemanha) e o procedimento padrão, conforme descrito por Smith et al (1985).¹² Para atingir a concentração mais exata dos padrões, as curvas de calibração de BSA nos solventes foram preparadas em duas etapas. Na primeira, preparou-se 600 μL dos padrões nos níveis de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e também 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tubos descartáveis com tampa; em seguida foram transferidos 100 μL de cada nível para tubos de vidro com tampa, em triplicata. Utilizou-se banho térmico a 60°C, em dois diferentes tempos de incubação: 15 minutos (1) e 30 minutos (2).

3. Resultados e discussão

3.1. Solubilidade

Avaliou-se a mudança de solventes e da temperatura de solubilização a fim de tentar reduzir o tempo de análise. Utilizando-se água à temperatura ambiente (cerca de 20°C), formaram-se grumos aparentemente insolúveis, sendo necessário que a mistura amostra-água permanecesse em repouso por várias horas a 2-8°C, até que se observasse sua solubilização. No entanto, a utilização de água resfriada a aproximadamente 4°C, possibilitou a utilização imediata da solução de PRP para a quantificação. Este procedimento foi baseado nos dados empíricos obtidos neste estudo e nas informações obtidas na literatura.^{1, 19, 20, 24}

Com a modificação do solvente para hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, mantendo à

temperatura ambiente, aparentemente as amostras apresentaram imediata solubilização, porém não se observou vantagens em relação ao uso da água resfriada à 4°C.

Para os métodos Lowry e Smith não foram observadas mudanças significativas na sensibilidade pela substituição de água por hidróxido de sódio (Figuras 2a e 2c). Foi comprovado estatisticamente que as curvas foram equivalentes nos dois solventes tanto para o método Lowry ($t_{\text{tab}} = 2,23$; $t_{\text{calc}} = 0,040$; $p = 0,97$), quanto para o método Smith ($t_{\text{tab}} = 2,23$; $t_{\text{calc}} = 0,073$ e $p = 0,94$).

Para o método Peterson, ao se substituir a água pelo hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, as curvas obtidas não demonstraram ser estatisticamente diferentes ($t_{\text{tab}} = 2,23$; $t_{\text{calc}} = 0,88$; $p = 0,40$), entretanto houve uma diminuição da sensibilidade do método, observada pela redução no coeficiente angular da curva de calibração obtida com o reagente alcalino (Figura 2b).

O método Lowry apresenta concentração global relativamente baixa e por isto pequenas variações nas concentrações de hidróxido de sódio não interferem na reatividade com o íon Cu²⁺. O mesmo não ocorre com o método Peterson, que parece estar usando a concentração limite de reagentes. Isto é coerente com a teoria de Brady e Humiston, de que há relação entre as variações de solubilidade e de concentração com a reatividade.^{8, 29} O SDS em meio alcalino é eficiente para a solubilização de produtos derivados de membranas proteicas, como é o caso do PRP. A desnaturação das proteínas pelo SDS aumenta a superfície de contato no meio reacional, contribuindo significativamente na formação do cromóforo e resultando na maior sensibilidade do método Peterson.^{6, 29}

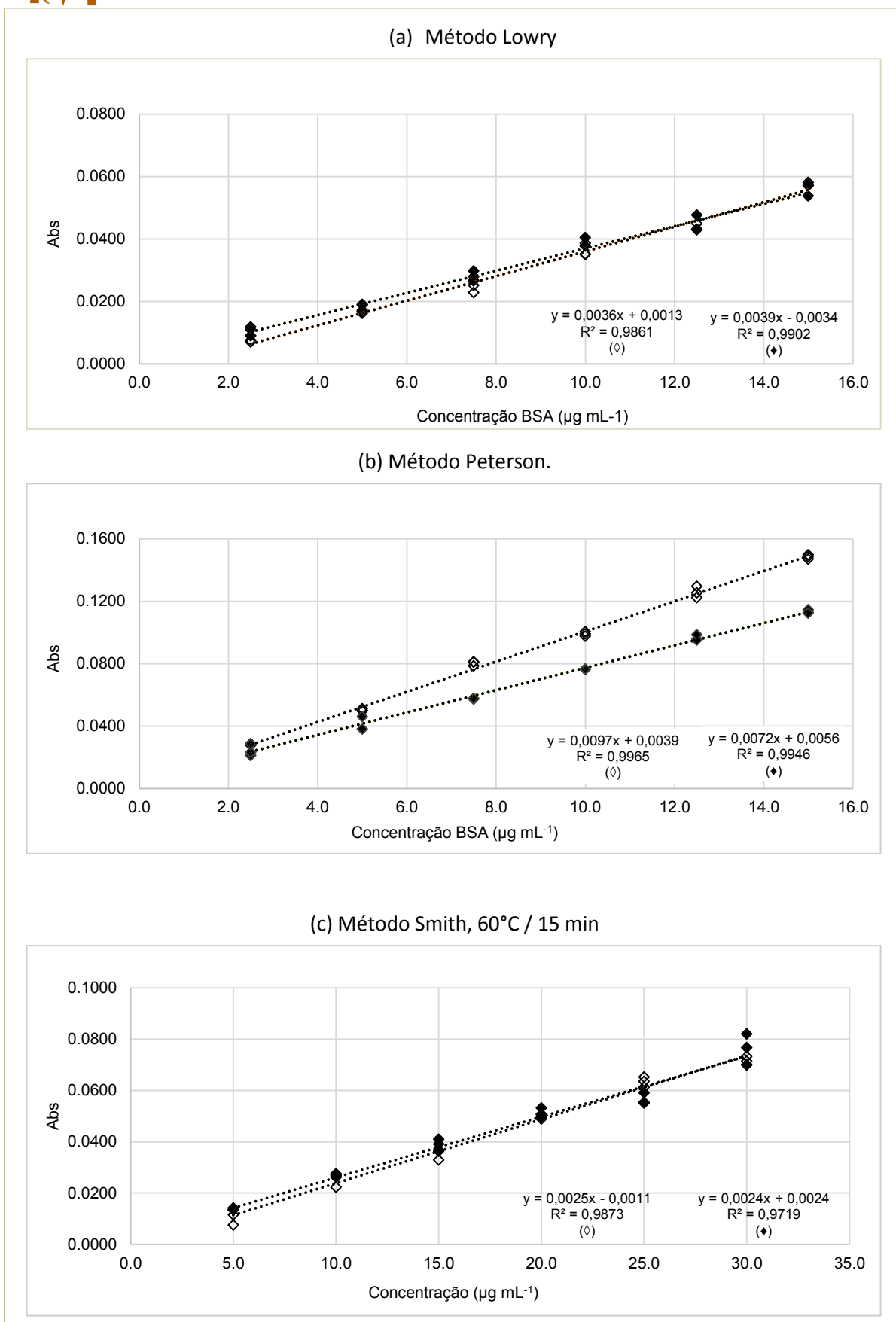


Figura 2: Variação dos solventes água ultrapura tipo 1 (\diamond); hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1} (\blacklozenge). Método Lowry; (b) Método Peterson; (c) Método Smith 60°C / 15 min.

Para o método Smith, utilizando-se o hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com variação do tempo de incubação (mantendo-se 60°C), obteve-se ganho considerável na sensibilidade, comparado ao tempo menor (Figura 3a), mas estatisticamente as curvas não demonstraram diferença entre si ($t_{\text{tab}}=2,23$; $t_{\text{calc}}= 1,98$; $p= 0,08$), provavelmente devido ao aumento da dispersão na temperatura mais alta. Porém a adição de 2% de SDS associado ao hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ diminuiu muito sua sensibilidade (Figura 3b). Pela observação da Figura 3b, constata-se que a presença do detergente SDS responsável pela desnaturação proteica, fez diminuir a sensibilidade do método Smith, não produzindo o efeito esperado de tornar os resíduos de aminoácidos mais acessíveis à reação. Estatisticamente manteve-se a semelhança das curvas ($t_{\text{tab}}= 2,23$; $t_{\text{calc}}= 1,69$; $p= 0,12$), mas com significância menor (Figura 3b).

Tendo em vista que a reação do método Smith é muito lenta à temperatura ambiente, considera-se que este não é um método de “ponto final” e o tempo e a temperatura foram considerados críticos na aplicação desejada. A temperatura de 60°C aparece sendo mais significativa que a temperatura ambiente, para o desenvolvimento da cor proveniente da reação das ligações peptídicas com o íon cobre divalente.¹²

3.2. Precisão na determinação da concentração de proteínas nas amostras de PRP empregando os métodos Lowry, Peterson e Smith

Atualmente a utilização do método Lowry para a determinação de proteínas do produto vacinal PRP está baseada nas recomendações internacionais.^{4,23} Isto se justifica para quantificar amostras no limite especificado para a impureza (1%, ou seja, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína). No entanto, as amostras produzidas em Bio-Manguinhos/Fiocruz tem demonstrado um nível desta impureza muito

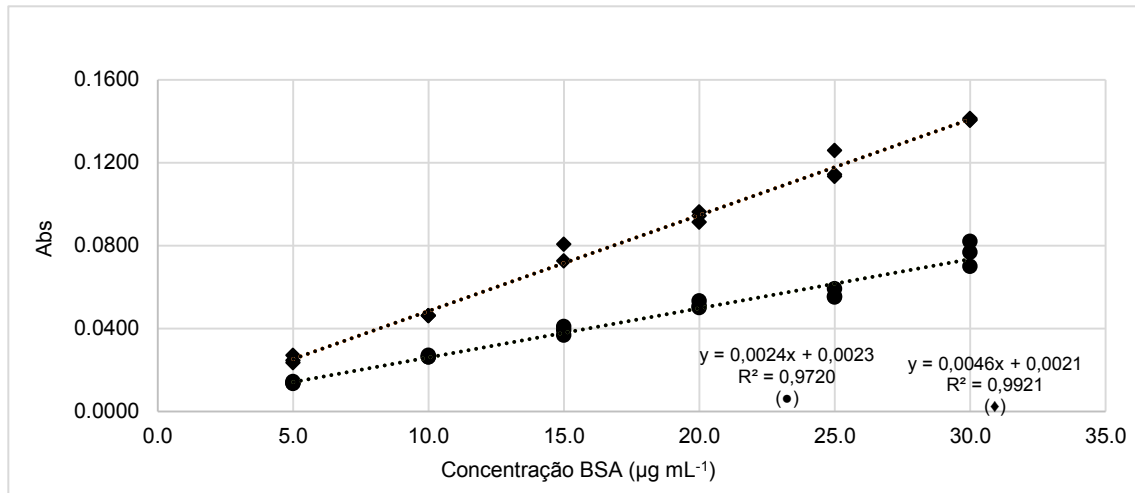
abaixo (aproximadamente $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o método clássico de Lowry com LQ de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ tem se mostrado inadequado para a quantificação.

A continuidade de utilização do método Lowry poderia se basear na concentração das amostras, mas isto torna-se um problema devido à solubilidade e ao fato de que o PRP é obtido com baixíssimo rendimento (aproximadamente 50 g por lote), portanto esta alternativa não seria viável. Então, para comparação dos três métodos, nas concentrações estimadas das amostras, foram utilizadas curvas de calibração de BSA com mais de 5 níveis para demonstração de sua linearidade.^{5,27} Conforme recomendação do Inmetro,²⁸ com o intuito de situar a concentração mais esperada para esta impureza nas amostras ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas totais) o mais próximo possível da região central da curva de calibração, no preparo da curva padrão para os métodos Lowry e Peterson foram utilizados os níveis de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Entretanto, para o método Smith foi necessário preparar também uma curva com intervalo maior ($5,0$ a $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), em função do volume final, a fim de se obter a mesma massa de BSA e tornar possível a correlação dos três métodos nos seis níveis de concentração. A Tabela 1 apresenta os dados obtidos das curvas padrão de BSA no intervalo de 2,5 a $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os métodos Lowry e Peterson e no intervalo de 5,0 a $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o método Smith, preparadas em solvente água.

Comparando-se os dados obtidos, observa-se que o método Peterson demonstrou maior sensibilidade e precisão, provavelmente devido à melhor solubilidade pela adição do SDS. Isto coaduna com a afirmação de que o método Lowry apresenta incertezas maiores em concentrações abaixo de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.³¹ O método Smith, demonstrou menor sensibilidade e precisão (para concentrações iniciais iguais), em relação ao método Lowry (Tabela 1).

(a) Variação do tempo de incubação do método Smith (solvente hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): $60^\circ\text{C} / 15 \text{ min}$ (●); $60^\circ\text{C} / 30 \text{ min}$. (◆).



(b) Variação dos solventes do método Smith (incubação $60^\circ\text{C} / 30 \text{ min}$): hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (◆); hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 2% de SDS (-).

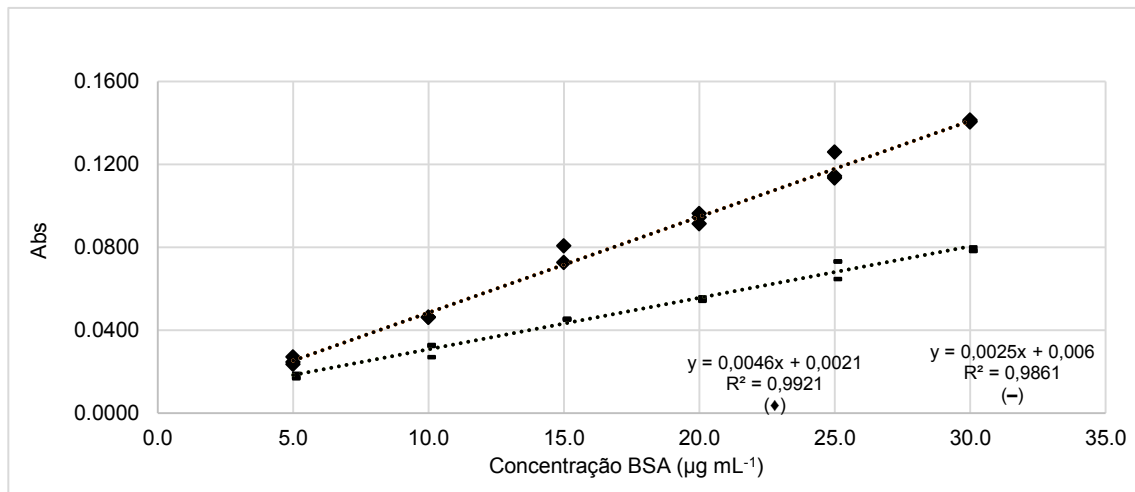


Figura 3. Método Smith. Variação dos solventes e do tempo de incubação. Variação dos solventes (incubação $60^\circ\text{C} / 15 \text{ min}$.): hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (◆); hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 2% de SDS (-); Variação do tempo de incubação (solvente hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): $60^\circ\text{C} / 30 \text{ min}$ (◆); $60^\circ\text{C} / 15 \text{ min}$ (●).

A Tabela 2 apresenta as concentrações e a precisão (RSD) obtidas na determinação das concentrações de proteína nas amostras de PRP de três diferentes lotes, pelos métodos

Lowry, Peterson e Smith. O método Peterson foi o único que atingiu a precisão adequada ($\leq 15\%$) na quantificação dos três lotes.

Tabela 1. Dados obtidos das curvas padrão de BSA no intervalo de 2,5 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os métodos Lowry e Peterson e 5,0 a 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método Smith, preparadas em solvente água.

Lowry			Peterson		Smith		
$y = 0,001 + 0,0036x$ $r = 0,9932.$			$y = 0,0039 + 0,0096x$ $r = 0,9976$		$y = 0,0034 + 0,0021x$ $r = 0,9944$		
Conc. BSA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média das leituras (Abs)	RSD (%)	Média das leituras (Abs)	RSD (%)	Conc. BSA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média das leituras (Abs)	RSD (%)
2,5	0,0100	13,5	0,0287	1,9	5,0	0,0140	9,2
5,0	0,0180	5,8	0,0503	1,5	10,0	0,0235	7,4
7,5	0,0280	5,6	0,0794	1,6	15,0	0,0370	5,6
10,0	0,0390	4,9	0,0990	1,5	20,0	0,0452	5,0
12,5	0,0450	6,0	0,1229	1,8	25,0	0,0568	3,4
15,0	0,0560	3,8	0,1484	0,4	30,0	0,0651	4,9

$\alpha = 0,95$; $n = 3$

Tabela 2. Quantificação de proteína nas amostras de PRP pelos métodos Lowry e Peterson, no intervalo de 2,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e Smith no intervalo de 5,0 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Curvas de calibração preparadas em solvente água

Amostra	Lowry		Peterson		Smith	
	Conc. BSA (%)	RSD (%)	Conc. BSA (%)	RSD (%)	Conc. BSA (%)	RSD (%)
Lote 1	0,0421	12,82	0,0403	5,04	0,0543*	17,47*
Lote 2	0,0353	14,88	0,0413	4,64	0,0430*	20,95*
Lote 3	0,0214	25,91	0,0441	5,17	0,0620	47,54

$n = 6$; $\alpha = 0,95$. * Exclusão de 1 outlier

3.3. Sensibilidade

Para comparar a relação concentração/resposta entre os três métodos, foram utilizadas as mesmas quantidades de analito (massa de BSA) relacionando as concentrações iniciais das alíquotas e os volumes finais dos ensaios

(Tabela 3). Para os métodos Lowry e Peterson fixou-se a quantidade de massa (1,0 µg) para alíquotas de 400 µL, no entanto para o método de Smith, cujo volume final é muito maior, foi mantida a alíquota de 100 µL, variando-se a concentração inicial da solução de trabalho, a fim de igualar as massas (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de BSA esperada (µg) no mesmo nível de concentração (2,5 µg mL⁻¹) para os métodos Lowry, Peterson e Smith

Método	Alíquota (mL)	Concentração inicial (µg mL ⁻¹)	Massa (µg)	Volume final (mL)	Concentração final (µg mL ⁻¹)	Resposta (Abs)
Lowry	0,400	2,5	1,0	2,6	0,38	0,0106
Peterson	0,400	2,5	1,0	1,0	1,00	0,0281
Smith	0,100	10,0	1,0	2,1	0,48	0,0280

A partir do cálculo da quantidade de proteína esperada de BSA, no menor nível de concentração dos métodos Lowry, Peterson e Smith (Tabela 3), foi possível comparar a sensibilidade entre os três métodos, expressa pela magnitude dos coeficientes angulares e representação gráfica das curvas de calibração, usando como solvente água ultrapura do tipo 1 (Figura 4a) ou hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (Figura 4b).

Pela representação gráfica das curvas de calibração e dos coeficientes angulares fornecidos pelas equações demonstrados na Figura 4, pode-se inequivocamente perceber a maior sensibilidade do método Peterson em comparação aos métodos Lowry e Smith. Deve-se destacar que mesmo com a utilização de temperatura de incubação mais elevada (60°C), o método Smith demonstrou sensibilidade menor que o método Lowry.

Em função do método Smith ter sido considerado inadequado para a dosagem das amostras biológicas em estudo, visto que pode ocorrer algum tipo de degradação com a temperatura testada (60°C) e isto interferir na quantificação das proteínas^{1,32}. Devido a reatividade ser uma função do tempo, pequenos incrementos de tempo acarretaram alterações substanciais nas leituras de absorvância e para a leitura de um número significativo de amostras, este fator é um ponto crítico. Visto que Smith não foi considerado um método robusto, apenas o método Peterson foi confrontado com o clássico Lowry nas avaliações do intervalo linear, sensibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação (Tabela 4).

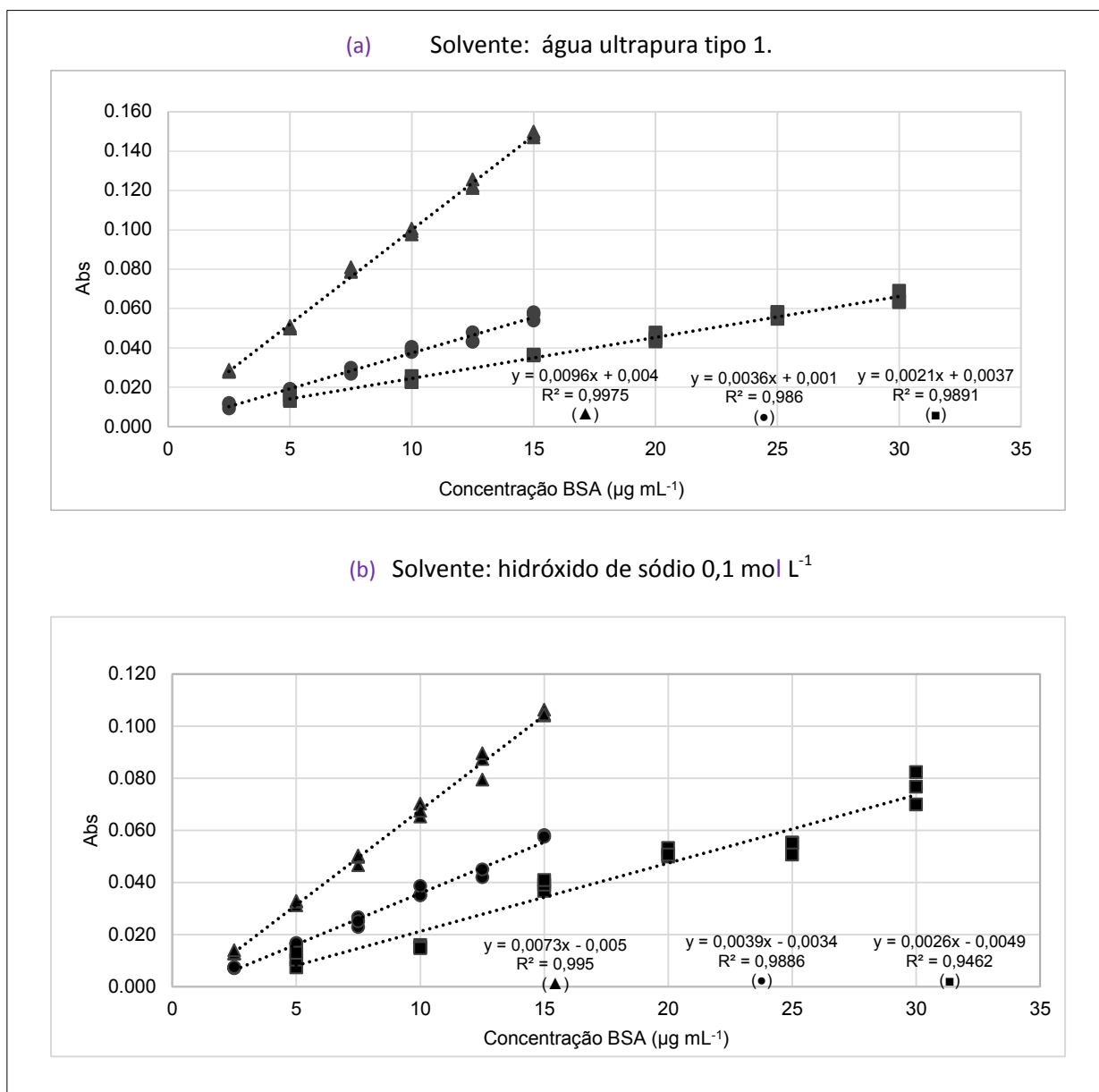


Figura 4. Relação concentração de BSA x resposta (Abs) dos métodos Lowry (●), Peterson (▲) e Smith, 60°C / 15 min (■),

3.4. Comparação entre os métodos Lowry e Peterson

Seletividade e efeito matriz

Na quantificação das proteínas residuais do PRP pelo método Peterson usando água ou solução de PRP a 10 mg mL⁻¹ não se observou diferenças significativas, visto pelos coeficientes de variação dos fatores de matriz (FM) todos muito abaixo do limite estabelecido (< 2%, limite de 15%) e também

pela avaliação estatística das curvas de calibração. Portanto, as curvas de calibração puderam ser preparadas em solvente água, uma vez que não foi observado efeito matriz.

Intervalo linear

A regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários foi adequada para os dois métodos utilizando-se água como solvente, uma vez que os dados de ambos confirmaram ser homocedásticos e

demonstraram linearidade. O método Peterson (no intervalo de 1,0 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) demonstrou excelente performance na avaliação da precisão na concentração mais baixa (RSD 1,9%). O método Lowry demonstrou menor precisão nas leituras de absorvâncias no nível de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RSD 13,5%), mas ainda dentro do limite para métodos bioanalíticos (RSD $\leq 15\%$).²⁷ Tendo em vista que os coeficientes de regressão foram superiores a 0,99 para todas as curvas de calibração avaliadas, no intervalo de 2,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no método Lowry, considerou-se que a menor concentração estudada (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pertence ao intervalo linear do método,^{5,28} apesar do seu limite de quantificação calculado ter sido superior a este valor (Tabela 4).

Sensibilidade

Considerando-se que a sensibilidade é dada pelo coeficiente angular b_1 das curvas de calibração descritas como $y = b_0 + b_1 x$, pode-se afirmar que o método de Peterson é o mais sensível, dada a magnitude do coeficiente angular em comparação com o método Lowry, por apresentar a melhor resposta para a mesma quantidade de massa adicionada para o mesmo nível de concentração (Tabelas 1 e 3).

Precisão

Na avaliação da precisão (Tabela 4) no intervalo de concentrações avaliado (2,5 a 15

$\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método Lowry e 1,0 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método Peterson), utilizando-se as mesmas amostras de PRP, o método Peterson obteve precisão de 6,0% enquanto o método Lowry demonstrou RSD 26,6%, muito acima do critério previsto pela Anvisa para métodos bioanalíticos ($\leq 15\%$),

Exatidão

Com os resultados obtidos para os métodos Lowry e Peterson, pode-se verificar que o método Peterson demonstrou maior exatidão na quantificação das amostras avaliadas (Tabela 2). Deve-se destacar que na avaliação inter-lotes das amostras analisadas pelo método Peterson, as concentrações estimadas para a proteína residual foram muito semelhantes, o que reforça a melhor atuação desse método na análise em questão.

Limites de detecção e de quantificação

Como as curvas de calibração obtidas experimentalmente para os métodos Peterson e Lowry demonstraram linearidade e homocedasticidade, os limites de detecção e de quantificação foram avaliados pressupondo a normalidade dos dados. Para o método Peterson o limite de detecção e quantificação calculados foram de 0,1 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o método Lowry de 4,6 e 15,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 4), corroborando com os obtidos por Santos (2012).

Tabela 4. Comparação entre os métodos Lowry (2,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Peterson (1,0 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Método	Linearidade ⁽¹⁾			Precisão ⁽²⁾		Exatidão ⁽³⁾	LD ⁽⁴⁾	LQ ⁽⁴⁾
	Equação da reta	r	C _{tab}	C _{calc}	(RSD)	(%)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Lowry	0,0010 + 0,0036x (n = 6)	0,993	0,616	0,374	26,6	95,8	4,6	15,4
Peterson	0,0043 + 0,0107x (n = 7)	0,998	0,561	0,422	6,0	97,2	0,1	0,5

(1) C_{tab} e C_{calc} referem-se aos valores críticos e calculados pelo teste de Cochran para comparação de variâncias.

(2) Média obtida da quantificação de amostras de três lotes distintos, n = 10 e $\alpha = 0,95$

(3) Recuperação do analito (BSA) a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; n = 5 ; $\alpha = 0,95$

(4) n = 3; LD = DP_a x 10 / b e LQ = DP_a x 3 / b, sendo, DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo y e b = coeficiente angular

método Lowry: $y = 0,0010 + 0,0036x$, r = 0,9932; $y = 0,0001 + 0,0037x$, r = 0,9983; $y = -0,0004 + 0,0037x$, r = 0,9860;

método Peterson: $y = 0,0043 + 0,0107x$, r = 0,9983; $y = 0,0034 + 0,0092x$, r = 0,9967; $y = 0,0039 + 0,0097x$, r = 0,9983;

3.5. Avaliação do método escolhido em condições de rotina

Na aplicação do método analítico selecionado para a análise de amostras de PRP foram empregadas para análise em condições de rotina parte das mesmas amostras dos três lotes experimentais de PRP

utilizadas na avaliação de desempenho do método (Tabelas 2 e 5), utilizando dados obtidos indiretamente da determinação de umidade residual para o cálculo, ou seja, as amostras usadas na quantificação não foram submetidas à secagem prévia, mas o resultado da umidade foi usado para correção.

Tabela 5. Avaliação do Método Peterson no intervalo de 1,0 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em condições de rotina

Equação da reta	r	Exatidão ⁽¹⁾		Precisão ⁽²⁾	
		Eficiência (%)	RSD	% proteína	RSD
$y = 0,0034 + 0,0092x$	0,9967	97,21	3,33	0,0420	5,9

(1) Recuperação do analito (BSA a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), n = 5; $\alpha = 0,95$. (*) n = 3; l = 7; C_{tab} = 0,561; C_{calc} = 0,389;

(2) média obtida da avaliação de três lotes distintos, n = 6 e $\alpha = 0,95$

Assim, obteve-se na quantificação das amostras 0,042% de proteína residual e RSD de 5,9%, com uma eficiência de 97,2%, para os três lotes avaliados.

4. Conclusão

O método Lowry demonstrou ser inadequado ao propósito definido, isto é, a quantificação de proteínas residuais contaminantes do PRP, visto que demonstrou valores de sensibilidade e precisão muito acima do limite aceitável para ensaios bioanalíticos ($\leq 15\%$).

Quanto ao método Smith, seus resultados foram insatisfatórios na avaliação de desempenho, e não correspondeu às expectativas quanto à sensibilidade. Além disso, a necessidade de incubação a 60°C o torna inadequado para a quantificação de biomoléculas, tais como o PRP, que não são estáveis a esta temperatura.

Portanto, o método Peterson é o mais indicado para a determinação de proteínas residuais em preparações vacinais a partir de polissacarídeos de *Haemophilus influenzae* tipo b, no intervalo de concentrações definido (1 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Provavelmente também aplicável a outros produtos que apresentem características semelhantes para os quais a quantificação de proteínas em nível residual é um ensaio crítico.

Concluiu-se também que o uso da água à aproximadamente 4 °C facilitou a solubilização e foi adequada para manter a integridade das amostras e evitar que eventuais produtos de degradação pudessem interferir nos resultados.

Referências Bibliográficas

- ¹ Sítio da World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/bs_2239_2>. Acesso em: 03 outubro 2014.
- ² Sítio Portal Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/casos-de-meningite-em-criancas-brasileiras-diminuiram-nos-ultimos-dois-anos>>. Acesso em: 03 fevereiro 2016.
- ³ Sítio da World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publication_s/trs/areas/vaccines/meningococcal/MenA%20Final%20BS204102.Nov.06.pdf>. Acesso em 03 outubro 2014.
- ⁴ *Farmacopeia Europeia*, 7a. ed., Council of Europe: 2011.
- ⁵ Sítio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/laboratorios.pdf>>. Acesso em: 03 abril 2016.
- ⁶ Peterson, G. L. A simplification of the protein assay of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* **1977**, *83*, 346. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Peterson, G. L. Determination of total protein. *Methods Enzymology* **1983**, *91*, 95. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal Biological Chemistry* **1951**, *193*, 265. [PubMed] [Link]
- ⁹ Peterson, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* **1979**, *100*, 201. [PubMed]
- ¹⁰ Wilson, K.; Walker, JM. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7a. ed. Cambridge University Press: New York, 2010. [Link]
- ¹¹ Miwa, A. C. P. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2006. [Link]
- ¹² Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fugimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, B. C.; . Measurement of protein using

- bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, 150, 76. [PubMed]
- ¹³ Johnson M., Protein Quantitation page. Disponível em: <<http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>>. Acesso em: 10 agosto 1014.
- ¹⁴ Zaia, D. A. M.; Zaia C. T. B. V.; Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova* **1998**, 21, 787. [CrossRef]
- ¹⁵ Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Olson B.; Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science. Wiley online library*, **2007**, 48, 341. [CrossRef]
- ¹⁷ Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8a. ed. Cengage Learning: São Paulo, 2008.
- ¹⁸ Gornall, A. G.; Bardawill C. J.; David, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* **1949**, 177, 751. [PubMed]
- ¹⁹ Kuo J. S. C.; *US pat. 4,196,192* **1980**.
- ²⁰ Peetermans, J.; Hauser, P.; *BR PI 9609414-1* **1996**.
- ²¹ Crisel, M. R.; Baker, R. S.; Dorman, D. E. Capsular polymer of Haemophilus influenzae, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *The Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250, 4926. [PubMed]
- ²² Martineau, E.; El Khantache, K.; Pupier, M. Sepulcri, P. Akoka, S.; Giraudeau, P. Non-linear effects in quantitative 2D NMR of polysaccharides: Pitfalls and how to avoid them. *The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 108, 78. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Sítio da World Health Organization. Disponível em: <www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO_TRS_897_A1.pdf>. Acesso em: 03 outubro 2015.
- ²⁴ Brossard C.; Henry M.; Raichvarg D.; *US pat 4,210,641* **1980**.
- ²⁵ Sítio da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 02 abril 2015.
- ²⁶ Sítio da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017_16_04_2010.pdf/b9a8a293-f04c-45d1-ad4c-19e3e8bee9fa>. Acesso em: 05 junho 2014.
- ²⁷ Sítio da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6ede b56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>. Acesso em: 05 junho 2014.
- ²⁸ Sítio do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 02 04 2015.
- ²⁹ Brady J. E.; Humiston G. E.; *Química Geral*, 2a. ed., LTC: São Paulo, 1986.
- ³⁰ Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* **1989**, 180, 136. [PubMed]
- ³¹ Santos F. R.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual Paulista, 2012. [Link]
- ³² Nelson D. L.; Cox M. M.; *Lehninger, princípios da bioquímica*, 3ª. ed., Câmara brasileira do livro: São Paulo, 2002.
- ³³ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Validação de métodos de ensaios químicos*, CD-ROM. Rio de Janeiro: Inmetro, 2013.

