



Análise instrumental aplicada à farmácia

Análise instrumental aplicada à farmácia

Claudia Hoffmann Kowalski Schröder

© 2017 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.
Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Presidente

Rodrigo Galindo

Vice-Presidente Acadêmico de Graduação

Mário Ghio Júnior

Conselho Acadêmico

Alberto S. Santana
Ana Lucia Jankovic Barduchi
Camila Cardoso Rotella
Cristiane Lisandra Danna
Danielly Nunes Andrade Noé
Emanuel Santana
Grasiele Aparecida Lourenço
Lidiane Cristina Vivaldini Olo
Paulo Heraldo Costa do Valle
Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

Revisão Técnica

Joseimo Willamys Duarte

Editorial

Adilson Braga Fontes
André Augusto de Andrade Ramos
Cristiane Lisandra Danna
Diogo Ribeiro Garcia
Emanuel Santana
Erick Silva Griep
Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Schröder, Cláudia Hoffmann Kowalski
S381a Análise instrumental aplicada à farmácia / Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder. – Londrina : Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017.
224 p.

ISBN 978-85-522-0128-1

1. Análise instrumental - Farmácia. I. Título.

CDD 545

Sumário

Unidade 1 Introdução aos métodos analíticos	7
Seção 1.1 - Fundamentos da análise instrumental	9
Seção 1.2 - Avaliação dos dados analíticos	25
Seção 1.3 - Métodos eletroquímicos	41
Unidade 2 Métodos cromatográficos	59
Seção 2.1 - Introdução às separações cromatográficas	61
Seção 2.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência	78
Seção 2.3 - Cromatografia gasosa	95
Unidade 3 Métodos espectroscópicos	115
Seção 3.1 - Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta e visível	117
Seção 3.2 - Espectroscopia de luminescência molecular	135
Seção 3.3 - Espectroscopia de absorção e emissão atômica	151
Unidade 4 Espectrometria de massas, espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear	171
Seção 4.1 - Espectrometria de massas	173
Seção 4.2 - Ressonância Magnética Nuclear	190
Seção 4.3 - Espectrometria no Infravermelho	205

Palavras do autor

Na atualidade, existe uma gama muito grande de técnicas analíticas a serem utilizadas para obter informações qualitativas ou quantitativas de uma amostra, e uma gama muito maior de problemas analíticos a serem resolvidos, sejam provenientes da área farmacêutica, alimentícia, cosmética, forense, ambiental, petrolífera ou outra.

Qual é a melhor técnica para determinar se a quantidade do solvente metanol, presente em um lote de maleato de midazolam, está dentro do limite permitido pela legislação? Qual é a melhor técnica para determinar qual foi a droga de abuso utilizada por determinado paciente que chegou ao hospital com convulsões e perda de consciência? No decorrer deste semestre, tentaremos responder juntos a perguntas como essas.

Assim, esta disciplina irá abordar as principais técnicas analíticas utilizadas na área farmacêutica e seus conceitos teóricos; os principais instrumentos e seus princípios de funcionamento; além das vantagens e limitações de cada técnica. Falaremos sobre como obter resultados confiáveis desses equipamentos e como extrair o máximo de informações relevantes.

A disciplina está dividida em quatro unidades: na Unidade 1 – Introdução aos métodos analíticos conheceremos as principais técnicas utilizadas nas medições analíticas, como selecioná-las e como obter os melhores resultados. Ainda, falaremos um pouco sobre os métodos eletroquímicos.

Já na Unidade 2 – Métodos cromatográficos estudaremos os princípios que regem a separação cromatográfica, bem como os principais instrumentos e aplicações para a área farmacêutica.

Na Unidade 3 – Métodos espectroscópicos detalharemos os princípios da espectroscopia atômica e molecular e conheceremos os diferentes instrumentos utilizados para essas medições.

Por fim, na Unidade 4 – Espectrometria de massas, espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear conheceremos essas três diferentes técnicas com utilizações diversas na área farmacêutica.

Vale sempre lembrar que qualquer instrumento, por mais moderno e automatizado que seja, nunca será capaz de realizar a interpretação crítica dos resultados. Essa é a sua função como farmacêutico. E o sucesso na interpretação desses resultados dependerá exclusivamente do conhecimento que você adquirir ao longo do seu caminho. Então, vamos iniciar a caminhada?

Introdução aos métodos analíticos

Convite ao estudo

Nesta unidade, iniciaremos nossos estudos sobre as principais técnicas analíticas utilizadas em laboratórios de análises químicas e farmacêuticas, considerando as diferentes áreas de atuação de um farmacêutico.

Falaremos sobre princípios importantes para a obtenção de resultados confiáveis, como uma amostragem adequada, uma avaliação estatística correta dos dados, a escolha da melhor técnica analítica e os erros e cuidados que devem ser observados durante uma análise química. Também, abordaremos a Eletroquímica e sua aplicação na área farmacêutica, de forma a cumprir com as competências e, por fim, obter os resultados esperados para esta unidade.

A seguir, conheceremos o contexto de aprendizagem para a Unidade 1:

A cachaça, denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48%, é a 3ª bebida destilada mais consumida no mundo e a 1ª no Brasil. Para garantir a qualidade do produto, inúmeras análises devem ser realizadas, dentre elas, a presença de espécies metálicas em concentrações abaixo do limite máximo estabelecido na legislação. O cobre, presente nos alambiques, apesar de aumentar a qualidade sensorial do produto final, é um dos metais que precisa ser monitorado, já que, em concentrações elevadas, torna-se prejudicial à saúde humana, podendo causar vômitos, dor abdominal, diarreia e anemia. Segundo a Instrução Normativa MAPA nº 15, de 31 de março de 2011, os níveis máximos de cobre na cachaça

não podem ser superiores a 5 mg.L⁻¹, embora em outros países o limite seja de 2 mg.L⁻¹, o que muitas vezes dificulta a exportação do produto para determinados mercados.

Um texto como esse nos faz refletir sobre várias questões, as quais, muitas vezes, são esquecidas por nós, mas que estão presentes no nosso dia a dia, por exemplo: quantos compostos tóxicos são consumidos diariamente por todos nós? O que diferencia um medicamento de um veneno, já que o cobre, por exemplo, é considerado um mineral essencial para o ser humano? Como são estabelecidos os limites máximos permitidos? Será que é possível que diferentes laboratórios, de diferentes países, utilizando diferentes metodologias e com diferentes analistas, cheguem ao mesmo resultado? Como garantir a confiabilidade de um laboratório?

Na Seção 1.1 – Fundamentos da análise instrumental conheceremos os métodos analíticos mais utilizados na área farmacêutica, quais as propriedades medidas por esses instrumentos, os critérios para a seleção do melhor método para cada caso, como a amostra deve ser coletada e preparada para a análise e os cuidados com o instrumento a ser utilizado.

Na Seção 1.2 – Avaliação dos dados analíticos aprenderemos como obter os melhores resultados de cada instrumento, como deverá ser realizado o tratamento dos resultados obtidos, o processo de validação de um novo método e como garantir a qualidade dos resultados ao longo do tempo.

Já na Seção 1.3 – Métodos eletroquímicos estudaremos com detalhes as principais características e aplicações desse grupo de técnicas, que envolve a potenciometria, coulometria e a eletrogravimetria.

Seção 1.1

Fundamentos da análise instrumental

Diálogo aberto

Prezado aluno, nesta primeira seção da disciplina de *Análise Instrumental aplicada à Farmácia*, estudaremos a importância das técnicas instrumentais nas análises realizadas nos laboratórios químicos e farmacêuticos, e como escolher qual delas é a mais adequada para cada caso. Introduziremos vários conceitos, os quais serão essenciais para o bom andamento de toda a disciplina.

Quem não se lembra do escândalo de doping que resultou na proibição de vários atletas russos de participarem dos Jogos Olímpicos Rio 2016 e na exclusão de toda delegação russa das Paraolimpíadas? Essa decisão, que quase gerou uma crise entre o governo da Rússia e o Comitê Olímpico Internacional (COI), foi baseada em resultados analíticos obtidos de laboratórios confiáveis, os quais utilizam equipamentos de última geração e de profissionais altamente capacitados para assumir essa responsabilidade.

No item *Convite ao Estudo*, nos deparamos com o problema do cobre em excesso na cachaça e, a seguir, discutiremos uma situação-problema relacionada a esse assunto.

O senhor João Pedro, produtor de cachaças artesanais, contratou o laboratório de análises físico-químicas MetalLabor para realizar as análises de metais requeridas na legislação, já que ele tem interesse em iniciar a exportação para outros países. O laboratório contratado se responsabilizou por todo o processo analítico, desde a coleta do material até a emissão do resultado final. Assim que recebeu o laudo com os resultados, João Pedro percebeu que a concentração de cobre encontrada foi de 6 mg.L^{-1} . Desconfiado do resultado, contratou um segundo laboratório, LabSulTox, para realizar a análise de cobre no mesmo lote de cachaça e, dessa vez, o resultado obtido foi de $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

Baseado nos seus conhecimentos, quais são as possíveis causas dessa variação tão grande nos resultados da análise de cobre?

O conhecimento de todo o conteúdo a ser abordado nesta seção será extremamente relevante para que você possa resolver essa questão.

Não pode faltar

A natureza da química analítica. O papel da química analítica. Classificação dos métodos analíticos. Química analítica quantitativa

A química analítica é o ramo da química que se preocupa em analisar as substâncias ou os materiais, ou seja, separar seus componentes e determinar a natureza e quantidade deles.

Sua natureza interdisciplinar faz com que ela seja vital em laboratórios médicos, industriais, governamentais e acadêmicos em todo o mundo, considerando as mais variadas áreas de conhecimento, como biologia, física, química, engenharias, medicina, farmácia, bioquímica, agricultura, ciências ambientais, ciência de materiais, geologia, ciências forenses, arqueologia, entre outras. Assim, os resultados oriundos de análises químicas são os responsáveis por decisões importantes tomadas diariamente nas mais variadas áreas de conhecimento.



Exemplificando

Na bioquímica, por exemplo, milhões de amostras de sangue são coletadas diariamente para análises, como hemograma e glicose. Na área ambiental, o monóxido de carbono é monitorado para verificar a eficiência dos dispositivos veiculares no controle de emissão de poluentes. Na ciência dos alimentos, a composição centesimal dos alimentos precisa ser determinada para que o alimento possa ser registrado e comercializado. A composição da atmosfera, hidrosfera e litosfera só foi possível devido às inúmeras análises qualitativas e quantitativas realizadas.

Na análise química, procura-se sempre responder a uma dessas duas questões: "O que está presente?", ou "Quanto está presente?". No primeiro caso, estamos falando da análise qualitativa. Já no segundo caso, da análise quantitativa. Nas duas situações, dá-se o nome de analito ao composto a ser identificado ou quantificado.

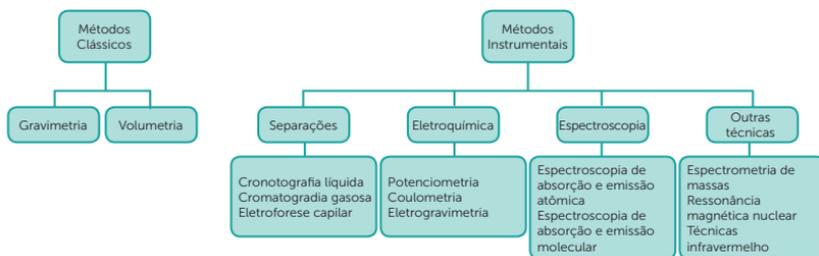
Métodos clássicos e métodos instrumentais. Classificação dos métodos instrumentais. Propriedades medidas.

Por mais de um século, somente os métodos clássicos eram utilizados para realizar essas medições. No caso das análises qualitativas, os componentes da amostra eram tratados com reagentes, gerando produtos com cores, solubilidade, cheiros ou outras propriedades características. Já nas medidas quantitativas, métodos gravimétricos ou volumétricos eram utilizados, sendo que, no primeiro, a massa do analito (ou de algum composto gerado a partir do analito) é determinada, e no segundo, mede-se o volume de um reagente padrão (de concentração conhecida) necessário para reagir completamente com o analito.

No início do século XX, estudos com outras propriedades (diferentes de massa e volume) começaram a ser realizados. Assim, propriedades elétricas, como potencial, passaram a ser medidas (métodos eletroanalíticos), bem como propriedades de interação da radiação eletromagnética com átomos e moléculas (métodos espectroscópicos), entre outras. Aliado a isso, técnicas cromatográficas começaram a substituir métodos tradicionais, como a destilação e a precipitação na separação de componentes de misturas complexas.

Assim, surgiu a Análise Instrumental, que engloba análises qualitativas e quantitativas, utilizando equipamentos desenvolvidos para realizar medições de alguma propriedade física ou química da matéria. Na figura a seguir, temos a classificação dos métodos clássicos e instrumentais.

Figura 1.1 | Classificação dos métodos clássicos e instrumentais



Fonte: elaborada pela autora.

Conforme já mencionado, os métodos instrumentais medem alguma propriedade física ou química da matéria (Tabela 1.1). Para que essa propriedade responda de forma mensurável ao analito, geralmente, precisa de uma fonte de energia externa, ou seja, um "estímulo". Esse "estímulo" pode ser de energia térmica, elétrica, eletromagnética, mecânica ou nuclear.

Tabela 1.1 | Propriedades físicas ou químicas utilizadas na análise instrumental

PROPRIEDADE	MÉTODO INSTRUMENTAL
Emissão de radiação	Espectroscopia de emissão (Raio-X, UV, Vis), fluorescência, fosforescência e luminescência
Absorção de radiação	Espectrofotometria e fotometria (Raio-X, UV, Vis, IV), Ressonância Magnética Nuclear
Espalhamento de radiação	Turbidimetria, nefelometria, espectroscopia Raman
Refração da radiação	Refratometria, interferometria
Difração da radiação	Difração de Raios-X
Rotação da radiação	Polarimetria, dicroísmo circular
Potencial elétrico	Potenciometria, cronopotenciometria
Carga elétrica	Coulometria
Corrente elétrica	Voltametria, amperometria
Resistência elétrica	Condutometria
Massa	Gravimetria
Razão massa-carga	Espectrometria de massa
Velocidade de reação	Métodos cinéticos
Características térmicas	Calorimetria diferencial de varredura, análise térmica diferencial
Radioatividade	Método de diluição isotópica e ativação neutrônica

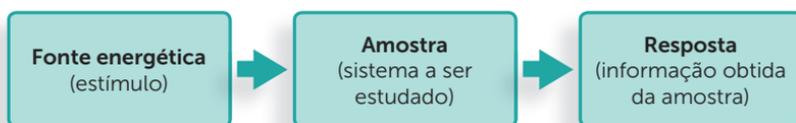
Fonte: adaptada de Holler (2009).

É importante salientar que, além desses métodos, existe um grupo de procedimentos utilizados para separar analitos muito semelhantes entre si, conhecidos como métodos cromatográficos ou cromatografia. Nesses casos, alguns dos instrumentos listados na Tabela 1.1 são utilizados para medir e quantificar o que foi separado pela cromatografia.

Domínio de dados. Domínio digital, analógico e do tempo. Sinais e ruídos.

Uma característica imprescindível de qualquer instrumento é que ele converta a informação obtida do analito em uma informação que possa ser manipulada e interpretada pelo analista. Assim, ele é um dispositivo de comunicação entre o sistema a ser estudado e o analista (Figura 1.2).

Figura 1.2 | Etapas fundamentais de qualquer medida analítica



Fonte: elaborada pela autora.

Como mencionado anteriormente, a resposta obtida da amostra nem sempre é de fácil compreensão pelo analista, por isso, são necessários dispositivos que convertam essa informação “codificada” em uma informação “descodificada”. As formas como essa codificação ocorrem são chamadas de “Domínios de dados” e, independentemente de qual for, tem como objetivo final a obtenção de um resultado numérico que seja proporcional à característica físico-química de interesse do analito.



Exemplificando

Em uma medida de β -caroteno em folhas de *espinafre*, utilizando um fotômetro com lâmpada de tungstênio como fonte de energia (estímulo), a informação obtida será um feixe de luz atenuado (devido ao processo de absorção de parte da energia pela amostra). Essa informação será selecionada por um filtro adequado e “capturada” por um fotodiodo, o qual transformará a informação em corrente elétrica. No processamento final do sinal, essa corrente será amplificada através de um amplificador e disponibilizada para o analista.

Os domínios elétricos podem ser divididos em domínio analógico, do tempo e digital.

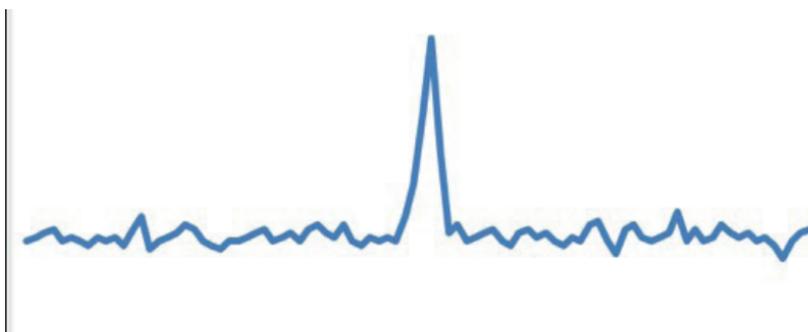
- Domínio analógico: a informação está codificada como a magnitude de corrente, diferença de potencial, carga ou potência, e pode ser correlacionada com tempo, comprimento de onda, intensidade de um campo magnético ou temperatura.

- Domínio do tempo: a informação é codificada no domínio do tempo, por exemplo, variação de um sinal elétrico em relação ao tempo.

- Domínio digital: a informação é representada por somente dois estados possíveis, como uma lâmpada de filamento ligada/desligada, um diodo emissor de luz, entre outras. A contagem dessa informação (oscilação entre os dois estados) é realizada por um dispositivo eletrônico, geralmente através do uso de números binários, usando códigos como "ligado=1" e "desligado=0".

Infelizmente, na prática, sinais analíticos livres de ruído nunca são obtidos em um laboratório (Figura 1.3). Por isso, medidas como a relação sinal/ruído (do inglês *signal/noise*, ou simplesmente *S/N*) são importantes para descrever a qualidade de um método analítico ou o desempenho de um equipamento quando comparado com outro, como será abordado na próxima seção.

Figura 1.3 | Efeito do ruído sobre uma medida analítica



Fonte: elaborada pela autora.



Qualquer medida analítica é constituída de dois componentes:

Sinal: contém a informação "desejada" sobre o analito.

Ruído: contém a informação "não desejada" e que não vem do analito, mas que está presente na medida, interferindo na qualidade do resultado.

Dois tipos de ruídos afetam uma análise química. Um deles é o ruído químico, o qual deriva de variáveis que afetam a química do sistema que está sendo medido, por exemplo, a mudança na intensidade luminosa no laboratório pode afetar materiais fotossensíveis, como a Vitamina A. Esse tipo de ruído, de um modo geral, é mais facilmente controlável. Já o ruído instrumental está associado aos componentes elétricos do instrumento, como a fonte de alimentação, os transdutores e os processadores. Além deles, ruídos provenientes de estações de rádios ligados, de elevadores ou de descargas elétricas (relâmpagos) podem interferir na medição.

CrITÉRIOS para seleção de métodos instrumentais

Alguns critérios devem sempre ser observados na escolha da melhor técnica instrumental para a realização de uma medida, conforme descrição a seguir:

- **Exatidão requerida:** a exatidão pode ser definida como o grau de certeza de que o resultado obtido naquela análise é realmente confiável. Na maioria dos casos, maior confiabilidade é obtida com instrumentos mais caros e que envolvam investimento de tempo e treinamento especializado. Por isso, na seleção de um método, deve haver um compromisso entre exatidão requerida para determinada análise, tempo e recursos financeiros disponíveis.
- **Quantidade de amostra disponível:** a amostra a ser obtida deve ter a mesma composição do material de origem, ou seja, ser representativa. Dependendo do tipo de amostra a ser analisada, a quantidade disponível é pequena, por exemplo, nas análises forenses, nas quais resíduos de pólvora coletados das mãos de

um suspeito podem ser as únicas amostras disponíveis para a resolução de um crime. Nesses casos, equipamentos altamente sensíveis e que usem volumes muito pequenos de amostra são necessários. Já nos casos de uma análise de teor de um fármaco em um medicamento, geralmente, há disponibilidade de grande quantidade de amostra.

- **Concentração do analito:** utilizando os mesmos exemplos anteriores, um fármaco que está presente em altas concentrações (geralmente porcentagem) não necessita de um equipamento altamente sensível para sua quantificação. Já para a quantificação de resíduos de antimônio, bário e chumbo, em uma amostra coletada das mãos de um suspeito, um método altamente sensível é necessário.

- **Interferentes:** a maioria das propriedades físicas ou química medidas não é exclusiva de uma única substância química, mas de um grupo de elementos ou compostos. Essas espécies presentes, que não são os analitos de interesse, são chamadas de interferentes. Eles devem ser identificados e separados dos analitos, para que estes sejam corretamente medidos.

- **Propriedades físico-químicas da amostra:** características, como a solubilidade de uma amostra líquida em determinado solvente, são fundamentais de serem observadas antes de iniciar uma análise. Da mesma forma, existem amostras sólidas ou gasosas, e suas características precisam ser consideradas para que o melhor método seja escolhido.

- **Número de amostras a serem analisadas:** deve-se levar em consideração essa questão, já que, quanto maior o número de amostras, maior o tempo de dedicação do equipamento e do analista, e maior o custo envolvido na análise. Nesse caso, um método o mais automatizado possível (que requeira o mínimo tempo do analista) é o mais adequado.

Além desses pontos abordados, o tempo de obtenção do resultado, a quantidade de resíduos químicos gerados, a conveniência, o custo e a disponibilidade do equipamento, o custo da manutenção e o custo da análise (padrões, solventes, gás, energia elétrica, consumíveis, etc.) devem ser considerados na escolha.

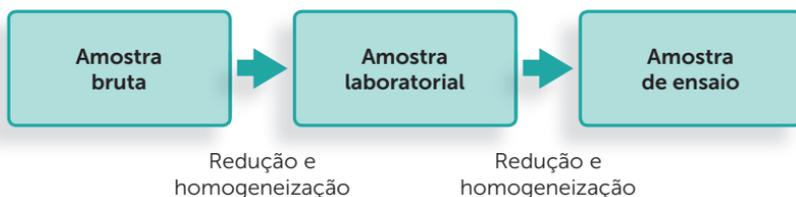
Amostragem. Preparo de amostras. Padronização e calibração de métodos analíticos

Por mais que um equipamento atenda aos melhores critérios de medição, se a amostra enviada ao laboratório não for representativa do material, ou se o método de preparo da amostra não for adequado, o resultado obtido não representará a realidade da amostra.

Amostragem pode ser definida como a retirada representativa de material para análise e controle. Em geral, amostras de medicamentos possuem uma composição simples constituída do(s) fármaco(s) e excipientes. Também, possuem um grau de homogeneidade alto, pois passam por um controle de qualidade rígido da indústria e do órgão fiscalizador. No entanto, essa situação é diferente quando fármacos são analisados em amostras de fluidos biológicos, ervas medicinais, águas de abastecimento ou outras matrizes. Como regra, diz-se que, aproximadamente, 1/3 do erro proveniente de uma análise é decorrente de uma amostragem inadequada.

As etapas de um processo de amostragem estão representadas na Figura 1.4. A amostra (amostra bruta), geralmente, tem grande volume ou massa, pois precisa ser representativa de todo o lote. No entanto, para ser enviada ao laboratório (amostra laboratorial), ela precisa ser reduzida (e mesmo assim continuar sendo representativa). Uma vez no laboratório, a amostra será novamente reduzida (ainda mantendo a homogeneidade) para o volume ou para a massa a ser analisada, conforme o método (amostra de ensaio).

Figura 1.4 | Etapas de um processo de amostragem



Fonte: adaptada de Soares (2006).

O erro total envolvido em um processo é conhecido como incerteza e é expresso como a variância total dos resultados ($s_t^2 =$ desvio padrão total elevado ao quadrado). O s_t^2 é dado pela soma da variância devido à amostragem (s_{am}^2) e da variância devido ao método laboratorial (s_m^2), conforme apresentado a seguir.

$$s_t^2 = s_{am}^2 + s_m^2$$

$$s_t^2 = s_{am}^2 + s_m^2$$

Dentre os tipos de amostragem, elas são divididas em dois grandes grupos: probabilísticas e não-probabilísticas. No primeiro caso, todos os elementos da população têm a mesma probabilidade de integrarem a amostra, que deve ser finita e totalmente acessível. Os principais tipos de amostragem probabilística são:

- Amostragem aleatória simples: sistema de seleção da amostra por sorteio ou tabela de números.
- Amostragem aleatória sistemática: o produto é ordenado e a retirada da amostra é feita periodicamente.
- Amostragem aleatória estratificada: o lote é dividido em sublotes e, então, uma amostragem aleatória simples é realizada.

Já na amostragem não-probabilística, nem todos os elementos da população têm a mesma chance de integrarem a amostra, como quando parte do produto é inacessível, como em um processo de produção contínuo, em que toda a batelada ainda não foi produzida. Nesse caso, temos:

- amostragem intencional: focada em objetivos específicos do analista;
- amostragem não-intencional: o único critério é a conveniência em relação à coleta da amostra.



Refleta

No caso de uma amostragem não probabilística, não podemos incorrer no erro de pré-julgar um lote inteiro, cuja produção ainda não foi totalmente finalizada?

Em 2010, a ANVISA publicou uma resolução que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Nela, o processo de amostragem é abordado e detalhado. Aprenda um pouco mais lendo a Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010.

Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017_16_04_2010.pdf/b9a8a293-f04c-45d1-ad4c-19e3e8bee9fa>. Acesso em: 17 mar. 2017.

Uma vez que a amostra esteja no laboratório, ela precisa ser submetida a uma série de etapas, com o objetivo de separar os analitos de interesse dos demais componentes da amostra (matriz). Em tese, quanto mais complexa a amostra, mais complexo o preparo, já que será mais difícil eliminar todos os interferentes presentes, bem como evitar a perda de parte do analito de interesse.

O preparo de amostras deve ser, preferencialmente, um procedimento rápido, com poucas etapas, capaz de recuperar o máximo do analito da amostra e que produza resultados reprodutivos. A escolha por um ou outro procedimento de preparo dependerá, basicamente, das características da matriz e do analito e do tipo de instrumento que será empregado, conforme Tabela 1.2.

Tabela 1.2 | Comparação entre algumas das principais técnicas de preparo de amostra

TÉCNICA	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS
Extração Líquido-Líquido	Utilizada para a extração de compostos pouco voláteis. Produz grandes quantidades de resíduos químicos.
Extração em Fase Sólida	Utilizada para matrizes complexas. Altas recuperações do analito.
Microextração em Fase Sólida	Utilizada para compostos voláteis ou semivoláteis. Baixo (ou nenhum) consumo de solvente e pouca quantidade de amostra.
Extração por Fluido Supercrítico	Utilizada para amostras sólidas, semissólidas ou líquidas. Não necessita de solventes orgânicos.

Fonte: adaptada de Gil (2010).



Uma técnica de Extração de Fase Sólida foi recentemente patenteada pela Unicamp, o que nos mostra que essas técnicas estão sempre em evolução. Conheça mais no link a seguir. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=V7I6OEFuL-o>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

Resumindo, deve-se sempre lembrar que, independentemente do equipamento escolhido para a realização de determinada análise, alguns requisitos são básicos, como a calibração desse equipamento, o uso de padrões e reagentes de qualidade, o uso de vidrarias adequadas, uma amostragem representativa, um método validado, ferramentas estatísticas apropriadas e analistas treinados. Na próxima seção, falaremos um pouco sobre a importância da calibração e validação dos métodos analíticos.

Sem medo de errar

Após finalizar essa seção introdutória da disciplina, vocês estão aptos para resolver a situação-problema proposta.

Brevemente, vamos relembrar a situação-problema, na qual o objetivo é a realização da análise de cobre em um lote de cachaça artesanal. Amostras do mesmo lote foram enviadas para dois laboratórios diferentes e os resultados obtidos foram 6 mg.L^{-1} e $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Para complicar, o produtor tem intenção de exportar, e o limite máximo permitido em vários países é de 2 mg.L^{-1} .

Considerando esse cenário, em qual resultado você confiaria? Ou talvez a pergunta seja: você confiaria em algum dos resultados?

Para responder, devemos voltar a alguns dos temas tratados nesta seção.

Primeiramente, podemos concluir que estamos falando de uma análise quantitativa, já que queremos saber “quanto” de cobre está presente na amostra. Além disso, não nos foi informado se os laboratórios utilizaram métodos clássicos ou instrumentais para a realização das análises. Mas, considerando o que vimos até agora, podemos supor que as análises foram realizadas por técnicas instrumentais, já que valores na faixa de mg.L^{-1} , ou seja, na ordem

de partes por milhão (ppm), são valores baixos para serem medidos por gravimetria ou titulometria.

Sendo assim, duas possíveis hipóteses devem ser consideradas. A primeira é que o lote produzido não seja realmente uniforme e que o produtor tenha um grave problema no seu processo de produção da cachaça. A segunda hipótese é que ocorreu algum problema no procedimento analítico, que envolve desde a coleta da amostra até a emissão do resultado final. Como você tentaria resolver essa questão? Será que coletar amostras periodicamente do mesmo lote e analisá-las em um mesmo laboratório poderia nos ajudar a descartar a primeira ou a segunda hipótese? Sim, desde que o laboratório seja de confiança.

Então, uma das primeiras coisas a serem revistas diz respeito ao processo de amostragem. Não sabemos se somente uma amostra foi coletada, ou se o laboratório coletou várias amostras do mesmo lote. Também, não sabemos se, no caso de coletar várias amostras, o laboratório reduziu para somente uma amostra de ensaio, ou se analisou cada uma separadamente. Outra questão em aberto é se a coleta aconteceu antes ou após o processo de envase da cachaça. Segundo seu conhecimento, se fosse você o analista responsável pela coleta, como procederia?

Aqui, vale pontuar que, diferentemente do caso apresentado, em que o próprio laboratório realizou a coleta da amostra, na maioria dos casos, os laboratórios se limitam a emitir um resultado baseado somente na amostra recebida pelo laboratório. Inclusive, é interessante observar em vários laudos (resultados oficiais) a informação de que "o resultado diz respeito à amostra recebida pelo laboratório". Assim, na maioria dos casos, a responsabilidade da amostragem é do requerente, ou de alguém subcontratado por ele para realizar a amostragem, mas não do laboratório.

Além dessa etapa crítica relacionada à amostragem, outras questões precisam ser consideradas. Dentre elas (algumas listadas a seguir e outras que você pode levantar), quais você consideraria importantes de serem avaliadas?

Qual foia técnica utilizada no preparo utilizada? Será que ela conseguiu extrair 100% (ou próximo de) do cobre da matriz? Será que interferentes não foram extraídos e estejam interferindo na medida? Qual foi o equipamento utilizado nesta medição? Qual

é a exatidão deste equipamento nesta faixa de concentração? Pode ocorrer, por exemplo, de a exatidão ser tão baixa que o equipamento não consiga distinguir entre 1 e 10 mg.L⁻¹. Neste caso, esse equipamento pode ser utilizado nesta medição?

Outras questões que já podemos levantar considerando o que vimos até aqui, por mais que serão detalhadas na próxima seção: foram realizadas replicatas dessa análise? Se sim, porque o desvio padrão não foi apresentado? O equipamento utilizado estava calibrado e o método estava validado? Os padrões e solventes utilizados estavam na validade? Os analistas responsáveis pelas análises foram treinados?

Além do que foi apresentado até aqui, você também pode contribuir com outras hipóteses relacionadas a essa variação nos resultados. Qual é a sua hipótese?

Avançando na prática

A instabilidade das vitaminas

Descrição da situação-problema

Diferentemente do cobre, que é um composto metálico, logo é estável, muitas vezes, na área farmacêutica, nos deparamos com compostos termicamente instáveis, ou ainda fotossensíveis. As vitaminas são exemplos disso, pois são compostos bastante sensíveis, podendo ser degradadas por vários fatores, como temperatura, presença de oxigênio, luminosidade, umidade, pH, entre outros. Nesses casos, quais são os cuidados adicionais que você, como analista, precisaria tomar com uma amostra (seja de alimento, medicamento, cosmético ou suplemento alimentar) para garantir resultados confiáveis?

Resolução da situação-problema

Além de todos os cuidados já mencionados, as características da amostra precisam ser preservadas para garantir o resultado final. Por isso, dependendo da vitamina a ser analisada, cuidados específicos precisam ser tomados e um conhecimento prévio desses cuidados pelo analista é importante para não incorrer em falhas durante alguma etapa do processo analítico.

E quais seriam esses cuidados "extras"?

Um deles seria o controle de temperatura e oxigênio durante o armazenamento, preparo e análise de amostras contendo Vitamina C. Já a Vitamina K é estável ao calor, mas é fotossensível, por isso, um controle da luminosidade do laboratório durante o armazenamento e processamento da amostra é necessário.

Baseado em tudo que você viu até agora, quais outros cuidados você teria para garantir resultados confiáveis?

Faça valer a pena

1. Com relação aos critérios que devem sempre ser considerados na escolha do melhor instrumento para determinada medida, julgue cada uma das afirmações a seguir:

I. A quantidade de amostra introduzida no equipamento deve sempre ser a maior possível.

II. Equipamentos mais modernos permitem resultados mais confiáveis, podendo, inclusive, dispensar procedimentos de manutenção e calibração.

III. Interferentes são espécies presentes na amostra ou nos solventes utilizados no processo de extração, e que interferem na identificação ou quantificação do analito de interesse.

Considerando o texto-base, assinale a alternativa correta:

a) Somente a afirmativa I está correta.

b) As afirmativas I e III estão corretas.

c) As afirmativas II e III estão corretas.

d) Somente a afirmativa III está correta.

e) As afirmativas I, II e III estão corretas.

2. Uma análise química, independente da complexidade que tenha, é constituída de etapas que devem ser realizadas em sequência e que culminam no resultado da análise e em uma decisão a ser tomada pelo analista ou supervisor acerca desse resultado.

Dentre as alternativas a seguir, assinale a que representa fielmente a ordem em que cada uma das etapas deve ser realizada.

a) Amostragem, escolha do método, definição do problema, preparo da amostra, calibração e medição no equipamento, avaliação estatística dos dados e decisão.

b) Amostragem, definição do problema, escolha do método, preparo da amostra, calibração e medição no equipamento, avaliação estatística dos dados e decisão.

c) Definição do problema, escolha do método, amostragem, preparo da amostra, calibração e medição no equipamento, avaliação estatística dos dados, e decisão.

d) Definição do problema, amostragem, escolha do método, preparo da amostra, calibração e medição no equipamento, avaliação estatística dos dados e decisão.

e) Escolha do método, definição do problema, amostragem, preparo da amostra, calibração e medição no equipamento, avaliação estatística dos dados e decisão.

3. Em um determinado silo de armazenamento de milho, observou-se uma infestação muito grande de insetos, o que causou grande preocupação para os produtores, já que, geralmente, os insetos possuem uma elevada capacidade reprodutiva e são pequenos, ou seja, o nível de infestação cresce rapidamente, podendo deteriorar o produto. O analista encarregado de coletar amostras e enviá-las ao laboratório foi orientado a coletar somente partes afetadas da amostra, para assim tentar descobrir qual é o inseto causador da infestação.

Com base nos seus conhecimentos, assinale qual tipo de amostragem deve ser realizada.

a) Amostragem probabilística aleatória estratificada.

b) Amostragem não-probabilística intencional.

c) Amostragem não-probabilística não-intencional.

d) Amostragem probabilística aleatória simples.

e) Amostragem probabilística aleatória sistemática.

Seção 1.2

Avaliação dos dados analíticos

Diálogo aberto

Caro aluno!

Resultados analíticos confiáveis são essenciais para que qualquer indústria, seja farmacêutica, cosmética, alimentícia ou de qualquer outro ramo de atividades, tenha credibilidade no mercado atual altamente competitivo. E para obter esses resultados, os laboratórios de controle de qualidade das próprias indústrias, os laboratórios externos subcontratados, ou ainda os laboratórios de fiscalização do governo, utilizam instrumentação analítica adequada a cada medição. No entanto, de nada vale a presença de equipamentos de última geração sem analistas capacitados para extrair desses instrumentos as informações necessárias, bem como tratar corretamente esses dados, validar o método em questão, realizar o controle de qualidade do produto, realizar as manutenções e calibrações no equipamento e, por fim, documentar corretamente todo esse processo.

Tudo que vimos na Seção 1.1 e veremos nesta Seção 1.2 será a base para a obtenção de resultados confiáveis para qualquer das técnicas que estudaremos a partir da Seção 1.3 e até o final desta disciplina. Por isso, dedique tempo de estudo nestas duas primeiras seções.

No item *Diálogo Aberto*, fomos apresentados ao senhor João Pedro, produtor e comerciante de cachaças artesanais no Brasil, que tem como sonho iniciar a exportação do seu produto. No entanto, o nível máximo de cobre permitido na cachaça, em alguns países, é 2 mg.L^{-1} , enquanto que, no Brasil, o valor máximo é 5 mg.L^{-1} . Por isso, ele teve que contratar novamente um laboratório para verificar se o seu produto atendia a esse novo critério. O primeiro laboratório contratado emitiu um laudo de 6 mg.L^{-1} . Desconfiado do resultado, contratou um segundo laboratório, e dessa vez o resultado obtido foi de $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

Diante disso, somos apresentados à nova situação-problema:

Apesar do segundo resultado ser satisfatório para João Pedro, ele ainda tinha dúvidas em relação à concentração real de cobre nas suas amostras de cachaça. Devido a isso, entrou em contato com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e foi redirecionado para o departamento responsável, no qual um farmacêutico muito experiente, perito em fiscalização de laboratórios, o atendeu e ouviu toda a descrição do caso. João Pedro, como já tinha pesquisado bastante sobre o assunto, esperava que o farmacêutico fizesse perguntas, como o nome dos laboratórios, a metodologia utilizada, se o método era validado, entre outras questões. Porém, para sua surpresa, o farmacêutico o orientou a procurar um laboratório acreditado pelo INMETRO na Isso NBR IEC 17025:2005, para a realização da análise em cachaça. Por fim, pediu para João Pedro prestar atenção no limite de quantificação do método antes de escolher o laboratório.

Na sua opinião, o farmacêutico agiu corretamente?

Para solucionar esse caso, convido você para iniciarmos o estudo desta nova seção. Vamos lá?

Não pode faltar

Tratamento e avaliação estatística dos dados

Vimos, na seção anterior, a importância de a amostragem ser representativa do todo, da escolha adequada do método de preparo da amostra e da escolha correta do equipamento que será utilizado para a medição. No entanto, tão importante quanto essas etapas são o cálculo correto dos resultados obtidos e a expressão desses resultados. Por isso, é importante que o analista conheça o significado das medições e seja capaz de, por exemplo, detectar e eliminar erros e construir curvas de calibração. Então, antes de nos aprofundarmos, é importante definir alguns conceitos importantes que serão utilizados nesta seção:

- Média: a média (\bar{X}) é obtida pela divisão da soma das medidas das réplicas pelo número de medidas do conjunto.
- Desvio padrão e desvio padrão relativo: o desvio padrão (s) é a forma mais útil de medir a dispersão dos dados e é calculada pela seguinte equação:

$$s = \sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 / n - 1}$$

No entanto, para que valores de desvio padrão de duas técnicas diferentes, por exemplo, possam ser comparados, o resultado expresso na mesma unidade, no caso, a porcentagem. Esse é o desvio padrão relativo (DPR), ou, do inglês, RSD. Com essa porcentagem é possível comparar quaisquer dois valores de s sem a influência do valor das médias.

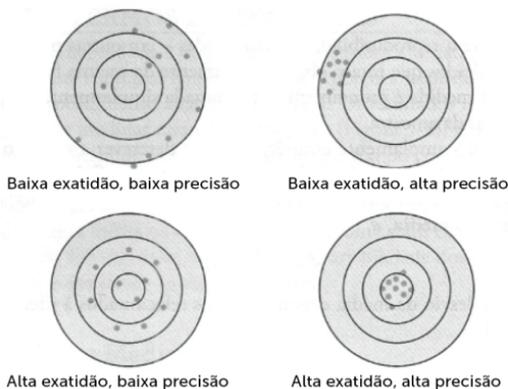
$$RSD = \frac{100 \times s}{\bar{X}}$$

- **Precisão:** é a medida obtida da repetição de uma mesma análise em uma mesma amostra, sendo que, quanto mais próximos os resultados das réplicas, maior a precisão. Geralmente, é expressa em termos de RSD.

- **Exatidão:** indica a proximidade entre o valor verdadeiro (X_v) de uma medida e o valor obtido experimentalmente (X_m), e é expressa como erro relativo (E). A Figura 1.5 ilustra os conceitos de exatidão e precisão.

$$E = \frac{X_m - X_v}{X_v} \times 100\%$$

Figura 1.5 | Visualização dos conceitos de exatidão e precisão



Fonte: Skoog (2015).

Resumindo, se avaliarmos diferentes réplicas de uma mesma medição, poderemos concluir que qualquer medida está sujeita a erro, ou seja, haverá sempre uma diferença entre o valor verdadeiro e o valor medido, e também entre os vários valores medidos. Dois

tipos de erros são sempre considerados em uma análise química, como veremos a seguir:

✓ Erros sistemáticos ou determinados: têm valor definido e causa identificável, e levam a um desvio em todo o conjunto de dados. Considerando a Figura 1.5, seria o alvo com “baixa exatidão e alta precisão”. São três as fontes de erros sistemáticos:

✓ Erros instrumentais: são causados por falhas na calibração dos equipamentos ou das vidrarias utilizadas na análise e, geralmente, são eliminados após a calibração do material.

✓ Erros pessoais: podem ser provenientes da falta de treinamento do analista, de uma limitação pessoal, como o daltonismo, ou ainda do pré-julgamento dos dados (tendência natural do ser humano de estimar leituras na direção da melhoria da precisão de um conjunto de dados).

✓ Erros de métodos: tipo mais grave, pois não pode ser eliminado, mesmo com um analista treinado ou um bom equipamento, já que o erro está na química aplicada para a obtenção dos resultados. Ocorrem devido a problemas, como incompletude de alguma reação química, instabilidade de alguma espécie medida, reações paralelas que interferem no processo de medição etc. O uso de material de referência certificado (MRC), que são amostras preparadas por entidades credenciadas e com certificados com o valor mais provável para certo analito, pode ajudar na detecção desse problema.

✓ Erros aleatórios ou indeterminados: são impossíveis de serem eliminados, pois são inerentes a qualquer processo de medição. Sempre existe uma incerteza associada, já que, após repetirmos qualquer análise, algumas vezes, veremos que os valores se distribuem ao acaso em torno de um valor médio, obedecendo a uma distribuição normal. Na Figura 1.5, seria o alvo com “alta exatidão e baixa precisão”, ou ainda “alta exatidão e alta precisão”, no caso de o erro aleatório ser pequeno. As principais causas são as variações ao acaso e de causa desconhecida, por isso de difícil controle por parte do analista, como corrente elétrica, umidade ou desempenho pessoal.



Assimile

Erros sistemáticos ou determinados afetam a exatidão dos resultados.

Erros aleatórios ou indeterminados afetam a precisão dos resultados.



Exemplificando

No nosso dia a dia, não prestamos atenção aos erros aleatórios, mas eles estão presentes quando medimos várias vezes uma parede ou um tecido com uma trena; no processo de fabricação de um prego ou qualquer outro objeto produzido em série. Na área farmacêutica, essa incerteza deve ser conhecida e, se possível, minimizada, já que existem valores máximos de RSD permitidos (geralmente, 2, 5 ou 10%) nos protocolos de validação.

Por exemplo, considere o conjunto de dados obtido de uma análise em quintuplicata de uma amostra de *Plagioscion squamosissimus* (pescada branca) coletada em um rio da bacia Amazônica para a determinação de metilmercúrio: $0,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,48 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Qual é o valor médio encontrado, o desvio padrão e o RSD?

A média foi de $0,506 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, o desvio padrão foi de $0,038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e o RSD foi de 7,6%. Nesse caso, se o limite máximo de RSD permitido for de 2 ou 5%, esse método não seria adequado para essa medição.



Refleta

Certo analista realizou a análise cromatográfica de uma amostra de medicamento, com o intuito de conhecer a dose de paracetamol presente. A área obtida do pico do cromatograma foi de 159560 mV (milivolts). É possível concluir alguma coisa somente com esse resultado?

Obtenção dos resultados instrumentais

Como já mencionamos, a maioria dos métodos analíticos, independentemente da propriedade a ser medida, requer algum tipo de calibração e, para isso, são utilizados padrões analíticos.

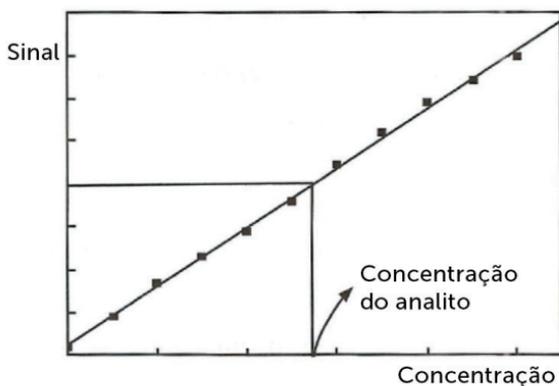
Padrões analíticos podem ser definidos com soluções líquidas ou na forma de pós de uma espécie química com estabilidade e natureza confiáveis. Geralmente, apresentam alto grau de pureza e podem ser adquiridos por fornecedores específicos, ou ainda podem ser preparados no próprio laboratório, dependendo da estrutura disponível.

No laboratório, geralmente, são preparadas várias diluições desse padrão com o solvente adequado, em diferentes concentrações. Esses padrões de concentração conhecida são medidos no instrumento sob as mesmas condições utilizadas para o teste da solução que se deseja determinar a concentração.

O padrão deve receber cuidados especiais no seu armazenamento para que não sofra degradação com o calor, a luz, a umidade etc. Além disso, deve ser armazenado em frasco inerte e bem vedado, a sua validade deve ser observada e sempre deve ser manipulado em ambiente adequado e com analistas treinados, já que erros na sua preparação podem comprometer o resultado final.

Após a análise desses padrões no instrumento, uma curva de calibração pode ser construída com os padrões, plotando-se os sinais obtidos em função das suas concentrações, e a amostra desconhecida pode ser medida por interpolação, como mostra a Figura 1.6.

Figura 1.6 | Curva de calibração: sinal versus concentração



Fonte: Gil (2010).

Ao traçarmos uma “curva” de calibração, sempre esperamos uma “reta” a mais “reta” possível para a leitura das soluções padrão, a qual será explicada pela seguinte equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde y é o sinal medido para cada solução analisada (por exemplo: absorvância, altura do pico), x é a concentração da solução padrão usada para cada ponto, a é o coeficiente angular e representa a inclinação da reta e b é o coeficiente linear e indica o ponto onde a reta corta o eixo y .

Assim fica fácil concluir que, dispondo de a , b e do sinal y do analito, podemos calcular a concentração x desconhecida do analito.



Assimile

O uso de padrões é fundamental em qualquer análise química, já que todo o processo de quantificação do analito desconhecido dependerá da curva analítica preparada, além de ser o principal parâmetro de exatidão.

Outro aspecto importante é saber o quanto que os valores experimentais obtidos se encaixam em uma reta e, para isso, usa-se o coeficiente de correlação de Pearson (r). Esse valor pode variar no intervalo entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que $r = -1$ descreve correlação negativa perfeita, $r = 0$ indica que não existe correlação entre x e y e, por fim, $r = 1$ indica correlação positiva perfeita.

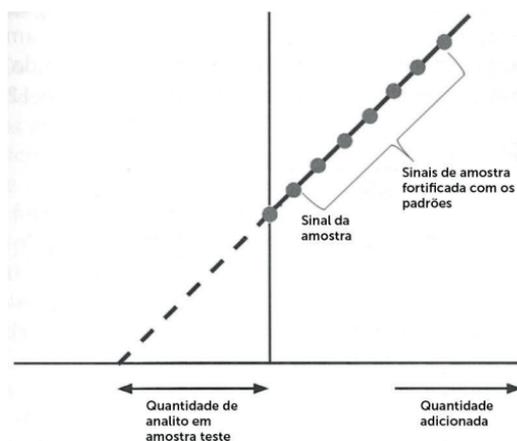
Vários tipos de procedimentos de calibração são conhecidos na análise química. A seguir, falaremos dos três mais utilizados:

- Calibração externa: padrões externos são utilizados quando não existe efeito matriz, ou seja, quando os demais compostos da matriz na qual o analito está não interferem na quantificação do analito. Na prática, as soluções padrões de diferentes concentrações são analisadas e os resultados plotados em uma curva analítica, obtendo-se, assim, o a e o b da curva. Em seguida, a amostra é analisada e o y é obtido, podendo-se calcular a concentração x do analito na solução analisada, conforme mostrado na Figura 1.6. Comumente, a solução analisada no equipamento é diferente da amostra inicial, já que a amostra pode ter passado por um processo de clean up seguido de uma diluição ou outro procedimento, por

isso, é imprescindível considerar essas diluições no cálculo final da concentração do analito na amostra. No caso da calibração externa, se todo o procedimento foi realizado adequadamente, valores de r maiores que 0,99 são obtidos. É importante salientar que, usualmente, realiza-se a análise de "brancos" como uma garantia a mais de que não existem outros compostos coeluinto com o analito ou atrapalhando na medida. Esses "brancos" são, geralmente, os solventes utilizados e/ou a própria amostra sem o analito de interesse.

- Adição-padrão: esse método é muito útil na análise de amostras complexas, nas quais o efeito matriz seja muito significativo. Ele pode ser realizado de várias formas, e uma das mais comuns é através do processo de fortificação, também conhecido como dopagem, contaminação ou, do Inglês, spiking. Nesse caso, a curva de calibração não é construída em um solvente, mas sim na própria amostra. Quantidades conhecidas e crescentes da solução padrão são adicionadas a volumes iguais da amostra, ou seja, a amostra é "fortificada" em diferentes níveis de concentração, exceto o primeiro ponto da curva que não recebe nenhuma "fortificação" (Figura 1.7). A mesma equação da reta é utilizada para calcular a concentração da amostra, mas dessa vez é realizada a extrapolação da reta até o ponto no eixo x que corresponda a $y = 0$, sendo que o valor obtido diz respeito à concentração do analito na amostra.

Figura 1.7 | Curva de calibração para o método de adição-padrão



Fonte: adaptada de Gil (2010).

- **Calibração interna:** um padrão interno é uma substância de referência similar ao analito, que é adicionada em concentração constante às amostras, padrões e brancos. A razão entre o sinal do analito e do padrão interno é representada no eixo y versus a concentração do padrão no eixo x , gerando um gráfico análogo ao apresentado na Figura 1.6, mas com essa peculiaridade no eixo y . Esse método é interessante para compensar erros sistemáticos ou aleatórios, já que os sinais, tanto do analito de interesse como do padrão interno, respondem proporcionalmente a qualquer flutuação na resposta.

Validação de métodos analíticos

Qualquer resultado analítico deve ser acompanhado de uma confiabilidade que possa ser demonstrada e comprovada. Esse processo é conhecido como validação do método. Diz-se que um método foi validado quando ele foi exposto a vários testes e apresentou resultados satisfatórios em todos eles, de acordo com a legislação pertinente. A seguir, veremos os parâmetros mais utilizados na validação de uma metodologia



Assimile

A validação tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar, ou seja, que sua performance permita produzir resultados que se enquadrem às necessidades do problema em questão.

- **Seletividade:** é o primeiro parâmetro a ser avaliado. Refere-se à capacidade do método de fornecer respostas para o analito de interesse sem a interferência de outras espécies presentes na amostra analisada. Infelizmente, nenhum método está totalmente livre de interferentes, por isso, um bom preparo da amostra é importante para minimizar os efeitos desses interferentes.

- **Linearidade:** é a capacidade do método de produzir resultados (sinais) diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa de aplicação previamente definida pela faixa dinâmica (a faixa dinâmica é a região em que existe uma relação

linear simples que obedeça à equação $y = ax + b$). A linearidade, geralmente, é calculada pelos métodos de padronização externa, padronização interna ou adição-padrão, conforme já estudado anteriormente.

- **Precisão:** como já vimos, a precisão representa a dispersão dos resultados obtidos de réplicas de uma mesma amostra. Geralmente, é expresso como repetibilidade (medições sucessivas sob as mesmas condições de medição), precisão intermediária (medições realizadas no mesmo laboratório sob condições variadas como diferentes analistas) e a reprodutibilidade (medições realizadas em estudos colaborativos com laboratórios diferentes e/ou métodos diferentes).

- **Exatidão:** grau de concordância entre um valor de referência (valor verdadeiro) e os resultados obtidos dos ensaios realizados com o método. Na prática, o valor verdadeiro não está disponível para uma amostra, então o procedimento normalmente empregado é a utilização de testes de recuperação, ou ainda o uso de Materiais de Referência Certificados (MRC).

- **Limite de detecção:** corresponde a menor concentração de um analito, que pode ser detectada pelo método (não necessariamente quantificada).

- **Limite de quantificação:** menor concentração de um analito que pode ser quantificado por um método, desde que atenda aos critérios de precisão e exatidão.

- **Robustez:** corresponde a alterações na resposta (sinal) quando pequenas alterações são realizadas no método, como a variação na temperatura da análise. Quanto menor a alteração na resposta, maior a robustez do método.

A escolha por um ou outro método dependerá, essencialmente, dos resultados obtidos nesses parâmetros.



Pesquise mais

A ANVISA, o INMETRO e o MAPA são três órgãos do governo brasileiro que publicam guias, manuais e resoluções a respeito de validação de métodos analíticos, com o intuito de harmonizar os procedimentos de validação e os respectivos critérios de aceitação. Para saber mais sobre

como é obtido, na prática, cada um desses parâmetros, leia o artigo de revisão indicado no link. Disponível em:

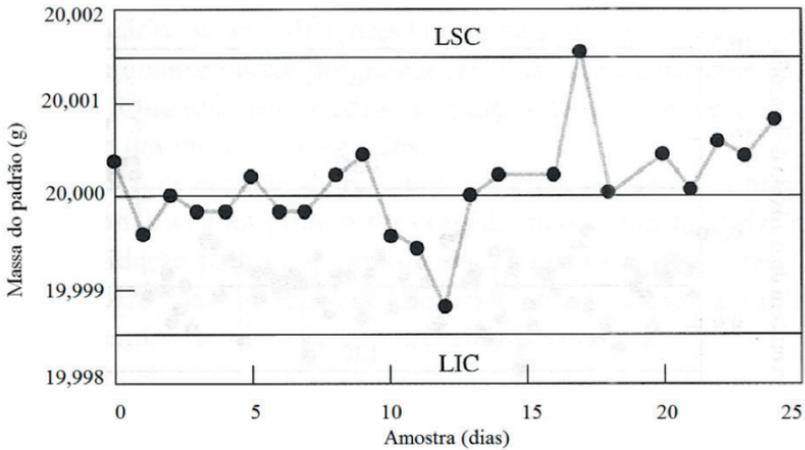
<http://quimicanova.sbg.org.br/imagebank/pdf/Vol27No5_771_16-RV03165.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2017.

Garantia de qualidade e acreditação de laboratórios

Na atualidade, várias legislações e estudos voltados para a garantia e o controle de qualidade das análises laboratoriais de medicamentos, cosméticos, alimentos, saneantes, entre outros, têm sido publicados e atualizados. Isso porque, mesmo utilizando métodos comprovadamente validados, os laboratórios precisam demonstrar que os resultados obtidos na rotina diária merecem credibilidade também.

Dentre as formas de garantir resultados confiáveis, algumas já explanamos, como o uso de padrões de referência e MRC na rotina, a realização de manutenção preventiva e corretiva nos equipamentos, o uso de vidrarias calibradas RBC (Rede Brasileira de Calibração) e o uso de reagentes com pureza elevada (PA ou superior). Outra forma muito interessante é o uso de cartas de controle estatístico (ou gráficos de controle). Tratam-se de gráficos que medem sequencialmente alguma característica importante da análise, como o sinal obtido da análise de um MRC no decorrer do tempo, ou a massa de um peso-padrão (peso-padrão são pesos certificados utilizados para a calibração e verificação intermediária de uma balança) no decorrer do tempo. Esse tipo de gráfico possui limites superiores (LSC) e inferiores (LIC) de controle e, se algum resultado sair fora desses limites, a causa deve ser investigada (Figura 1.8).

Figura 1.8 | Carta controle de um peso-padrão em uma balança analítica



Fonte: Skoog (2015).

Tudo o que foi visto até agora, nesta unidade, é considerado como essencial para que um laboratório possa ser acreditado pela ABNT NBR ISO/IEC 17025. A ISO (*International Organization for Standardization*) tem como principal atividade o estabelecimento de normas técnicas e gerenciais a serem utilizadas por parte dos governos e das lideranças para regulamentar um setor. Sendo assim, na área de laboratórios de ensaio e calibração, a norma exigida pelo governo para que um laboratório seja considerado capaz de produzir resultados confiáveis e para que seja um laboratório credenciado pelo governo para a realização de análises fiscais é a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Sem medo de errar

Nesta Seção 1.2, foi proposta a você uma situação-problema em que o produtor de cachaças João Pedro entra em contato com o MAPA para auxiliá-lo a entender qual dos resultados de análise de cobre na cachaça estaria correto, já que dois laboratórios analisaram o mesmo lote e obtiveram resultados bem discrepantes.

Na seção anterior, já discutimos quais são as possíveis causas dessa variação. Agora, a situação-problema nos convida para avaliarmos com bastante cautela a recomendação do

farmacêutico do MAPA em relação ao que o produtor deve fazer a partir de agora. Relembrando a recomendação dada ao produtor: “[...] procurar um laboratório acreditado pelo INMETRO na ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a realização desta análise em cachaça e prestar atenção no limite de quantificação do método antes de escolher o laboratório”.

Com base no que você aprendeu até agora nesta disciplina, o farmacêutico agiu corretamente?

Vamos pensar em tudo (ou quase tudo) que afeta um resultado analítico: amostragem, preparo da amostra, analistas treinados, equipamentos calibrados, método validado, controle de qualidade de rotina, uso de padrões e reagentes adequados, tratamento dos dados, condições ambientais, registro e transcrição dos dados, enfim, a lista é interminável!

E por que o farmacêutico deu uma resposta tão simples? Será que o fato de um laboratório ser acreditado pelo INMETRO na ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a realização de determinada análise é suficiente para cumprir todas as questões levantadas no parágrafo anterior e garantir resultados confiáveis?



Pesquise mais

Leia sobre a Norma 17025 (ABNT, 2005) e veja como ela abrange todas as questões que levantamos nesta seção e na seção anterior. Disponível em: <<http://www.smarnet.com.br/qualidade/metrologia/17025.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

Acredito que todos concordamos que sim. Quando um laboratório atende aos requisitos dessa norma específica (que tem como base a norma ABNT NBR ISO 9001, mas com requisitos específicos para laboratórios de ensaio e calibração), diz-se que o laboratório é acreditado pelo mais alto órgão de acreditação existente, já que, devido aos acordos de reconhecimento mútuo, essa acreditação é válida em qualquer lugar do mundo.

E quanto à segunda recomendação: “prestar atenção no limite de quantificação do método antes de escolher o laboratório”? Conforme o que vimos, se um método é acreditado, ele não

deveria, automaticamente, estar apto a realizar essa análise? Sim, desde que o método seja capaz de quantificar com precisão e exatidão valores na faixa de concentração que o produtor precisa.

Vamos relembrar o conceito de limite de quantificação (LQ): menor concentração de um analito que pode ser quantificado por um método, desde que atenda aos critérios de precisão e exatidão. Ou seja, um método pode ser acreditado pelo INMETRO e o seu LQ ser de 5 mg.L^{-1} . Nesse caso, o laboratório não atende ao limite que João Pedro precisa para essa análise específica. No entanto, o laboratório não deixa de ser um laboratório confiável para determinar valores acima de 5 mg.L^{-1} .

Finalizando, o farmacêutico deu instruções assertivas para João Pedro e, se ele as atender, certamente terá um resultado, finalmente, confiável.

Avançando na prática

O caso do medicamento ciprofloxacino

Descrição da situação-problema

No último ano, alguns lotes de solução injetável do medicamento ciprofloxacino $200 \text{ mg} / 100\text{mL}$, um antimicrobiano indicado para o tratamento de infecções de vias aéreas, trato urinário, cavidade abdominal, articulações e infecções generalizadas no corpo, tiveram suspensão da distribuição e recolhimento do estoque decretados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) devido aos resultados insatisfatórios em análises do teor do ativo. A Farmacopeia Brasileira especifica que tal medicamento deve conter, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 115,0% da quantidade declarada. Suponha que um lote foi liberado para comercialização pelo controle de qualidade da empresa após a resolução do impasse, o medicamento foi administrado para um grupo de pacientes que apresentou piora nos sintomas de infecção. Você realizou o doseamento de ciprofloxacina nesse mesmo lote, em quintuplicata, e obteve os resultados descritos a seguir.

Réplica	1	2	3	4	5
Teor encontrado	x	x	x		
$\text{mg} / 100\text{mL}$	212.3	195.5	187.8	224.3	219.6

Qual é a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (RSD) dos dados? Você emitiria um laudo constando que o medicamento está de acordo ou fora da especificação? Por quê? A empresa pode ser responsabilizada pela piora no estado de saúde dos pacientes?

Resolução da situação-problema

De acordo com os dados apresentados, a média dos cinco resultados foi de 207,9 **mg / 100mL** de ciprofloxacino, o desvio padrão foi de 15,7 **mg / 100mL** e o RSD foi de 7,5%. Considerando que os limites da Farmacopeia Brasileira são, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 115,0%, isso corresponde a uma variação aceitável entre 180 e 230 **mg / 100mL**. Sendo assim, esse lote do medicamento estaria dentro da especificação da Farmacopeia quanto ao teor do ativo, por isso, a empresa não poderia ser responsabilizada pelo estado de saúde dos pacientes. Porém, pense bem: os excipientes foram analisados? O teor de impurezas presentes está dentro da especificação?

Faça valer a pena

1. Erros aleatórios e erros sistemáticos fazem parte de qualquer medida e devem ser reduzidos sempre que possível, pois dependendo da sua magnitude, podem inviabilizar uma análise. No entanto, muitas vezes, não é possível identificar a causa e, como consequência, não é possível eliminá-la. Dentre as alternativas a seguir, assinale a que se refere somente a erros sistemáticos.

- a) Equipamento não calibrado e analista sem treinamento adequado.
- b) Variação na corrente elétrica e analista sem treinamento adequado.
- c) Ruído instrumental e equipamento não calibrado.
- d) Instabilidade do analito e vibração mecânica do equipamento.
- e) Analista sem treinamento adequado e vibração mecânica do equipamento.

2. Em uma análise química instrumental, todas as partes do equipamento devem passar por uma manutenção periódica para garantir que o equipamento esteja funcionando corretamente. Os picos obtidos de uma análise de aminoácidos em um cromatógrafo líquido reduziram em, aproximadamente, 50% de um dia para outro. O farmacêutico responsável permitiu a liberação do resultado mesmo nessa condição.

Posteriormente, verificou-se que o problema era o injetor, que estava injetando um volume inferior ao previamente definido para o método. Analisando o contexto apresentado acima, assinale o único método de calibração que garante que o farmacêutico tomou a decisão certa.

- a) Método de adição-padrão.
- b) Padronização interna.
- c) Normalização.
- d) Calibração externa.
- e) Comparação de área com o padrão.

3. Durante a validação de um novo método para determinação de uma impureza metálica em um medicamento, o analista responsável avaliou todos os parâmetros recomendados pela ANVISA para essa análise. Na transcrição dos dados das planilhas do Excel para o relatório de validação, ele precisou colocar em uma tabela o resumo dos resultados obtidos.

Parâmetro	Resultado
1. Linearidade	a. 99,5 %
2. Precisão	b. $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
3. Exatidão	c. $r = 0,998$
4. Limite de detecção	d. 4,85 %
5. Limite de quantificação	e. $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Relacione os parâmetros avaliados (coluna da esquerda) com os resultados obtidos (coluna da direita).

Assinale a alternativa que contém a associação correta.

- a) 1b, 2d, 3c, 4a, 5e.
- b) 1b, 2c, 3e, 4a, 5e.
- c) 1d, 2a, 3c, 4e, 5b.
- d) 1c, 2d, 3a, 4e, 5b.
- e) 1c, 2d, 3a, 4b, 5e.

Seção 1.3

Métodos eletroquímicos

Diálogo aberto

Querido aluno!

Nas duas primeiras seções desta Unidade I, conversamos sobre as principais características dos métodos instrumentais e sobre a criticidade de realizar corretamente alguns procedimentos para que resultados confiáveis sejam obtidos.

A partir desta seção, iniciaremos o estudo das principais técnicas instrumentais utilizadas na área farmacêutica e química, começando com os métodos eletroquímicos, também conhecidos como métodos eletroanalíticos.

Assim, voltamos à situação-problema que temos analisado nesta unidade:

O senhor João Pedro é produtor e comerciante de cachaças artesanais, e tem como objetivo iniciar a exportação do seu produto. No entanto, o nível máximo de cobre permitido na cachaça, em alguns desses países, é de 2 mg.L^{-1} , enquanto que no Brasil o valor máximo é de 5 mg.L^{-1} . Para isso, ele contratou dois laboratórios, que apresentaram laudos com resultados divergentes, e então, entrou em contato com o MAPA para pedir ajuda. Assim, recebeu a recomendação de procurar um laboratório acreditado pelo INMETRO na NBR 17025 (ABNT, 2005) para a realização dessa análise em cachaça e que atendesse ao limite de quantificação necessário.

Diante desse cenário, somos apresentados à última situação-problema desta Unidade:

João Pedro seguiu a recomendação do farmacêutico e, enquanto aguardava o resultado do laboratório acreditado pelo INMETRO, verificou que o laboratório MetalLabor utilizou o Método Potenciométrico com Eletrodo Íon Seletivo de cobre, enquanto que o laboratório LabSulTox utilizou a Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite. Considerando o que

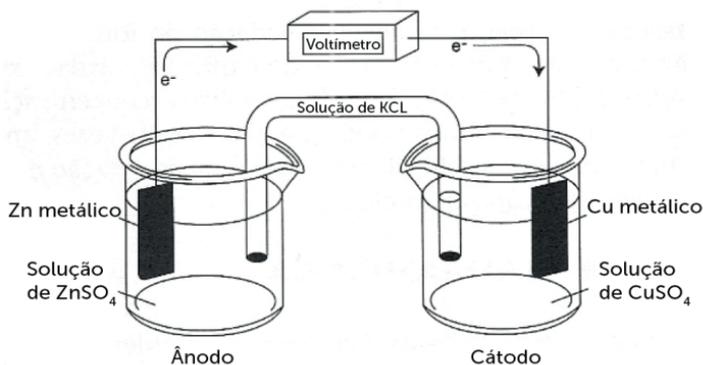
foi estudado nesta Unidade 1, quais são as principais características de cada uma das duas técnicas? Você considera que as duas foram apropriadas para a medição do cobre na amostra em questão?

Estamos juntos em mais essa etapa? Então, vamos lá!

Não pode faltar

Os métodos eletroquímicos se baseiam nas propriedades elétricas de uma solução contendo o analito, quando esta faz parte de uma célula eletroquímica. E o que é uma célula eletroquímica? Basicamente, compreende dois condutores elétricos, chamados de eletrodos, conectados externamente por um condutor metálico, cada qual imerso em uma solução de eletrólitos. As duas soluções de eletrólitos precisam estar em contato para permitir o movimento dos íons de uma para a outra, e esse contato é realizado através de uma ponte salina, conforme mostrado na Figura 1.9.

Figura 1.9 | Célula eletroquímica clássica (Célula de Daniel)



Fonte: Soares (2006).

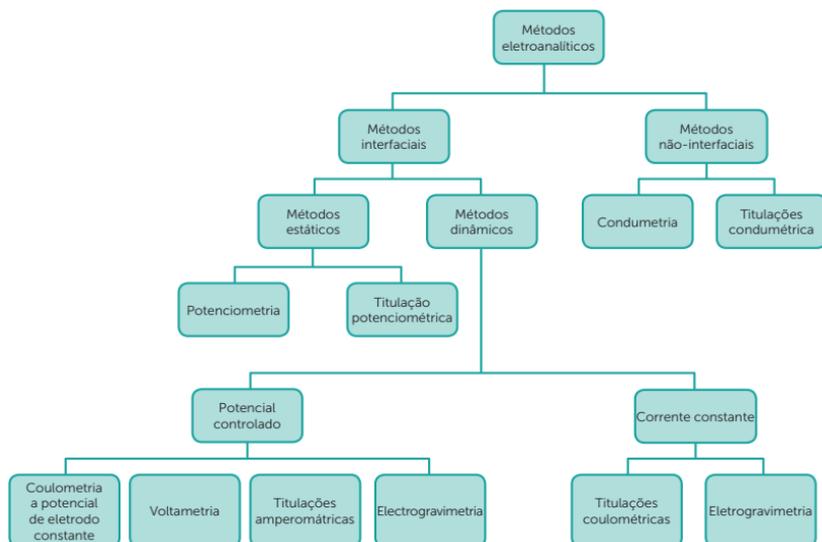
Quando um voltímetro de alta resistência é substituído por um de baixa resistência, tem início o fluxo de cargas por três processos distintos: por meio do condutor metálico externo (elétrons transportam carga entre os dois eletrodos, gerando um circuito elétrico), dentro das soluções (o fluxo de eletricidade envolve a migração tanto de cátion como de ânions) e nas superfícies dos eletrodos (processo de oxirredução).

As células eletroquímicas são de dois tipos: as células galvânicas e as eletrolíticas. Aquelas geram energia elétrica através da transformação de energia química em elétrica. Trata-se de um processo espontâneo (Figura 1.9), como as medidas potenciométricas. Já estas consomem energia elétrica através da transformação de energia elétrica em química. Essas não são espontâneas e necessitam de uma fonte externa de voltagem, como os métodos coulométricos e eletrogravimétricos.

Os métodos eletroquímicos apresentam algumas vantagens quando comparados aos métodos que veremos nas próximas seções, como simplicidade, rapidez, boa sensibilidade, alta seletividade (já que são específicos para um estado particular de oxidação, o que permite diferenciar, por exemplo, Cério III e Cério IV em uma mistura), baixo custo do equipamento (aproximadamente, 10% do valor de um instrumento espectrométrico). Também, fornecem informações sobre a atividade e não sobre a concentração de um analito; e permitem: aumentar as reações de eletrodo desejáveis e inibir as indesejáveis, mudando o material do eletrodo; o estudo de sistemas complexos em que ocorrem, simultaneamente, muitas reações de eletrodos, como a bioeletroquímica; medir concentrações de espécies eletroativas, fazendo uso da seletividade do potencial e do material do eletrodo; determinação *in loco* de um analito na amostra sem a necessidade de pré-tratamento da amostra; a análise de amostras coloridas e materiais em suspensão; e a determinação de analitos simultaneamente.

Eles são divididos em dois grandes grupos de métodos: os métodos interfaciais (baseados em fenômenos observados na interface entre a superfície do eletrodo e a fina camada adjacente) e não-interfaciais (baseados em fenômenos que ocorrem no seio da solução) (Figura 1.10). Nesta seção, estudaremos com mais detalhes a potenciometria, a eletrogravimetria e a coulometria.

Figura 1.10 | Resumo dos métodos eletroquímicos mais comuns



Fonte: adaptada de Holler (2009).

Medidas potenciométricas

As medidas potenciométricas, talvez, são as medidas químicas instrumentais mais realizadas em todo o mundo. São utilizadas em laboratórios clínicos, para determinar gases sanguíneos; em laboratórios de indústrias, para verificar o pH de seus produtos; na oceanografia, para determinar dióxido de carbono; pelo governo, para monitorar poluentes; entre outras milhares de aplicações.

Nas medidas potenciométricas, o objetivo é conhecer a atividade de uma espécie iônica específica em uma solução de eletrólitos. Assim, as condições são convenientemente arranjadas para que o potencial medido seja unicamente da espécie interessada. Para realizar as medidas, não ocorre passagem de corrente elétrica na célula, sendo que as variações de potencial medidas refletem a diferença de potencial da espécie em solução e na superfície do eletrodo. Os equipamentos utilizados, geralmente, são simples e de baixo custo, e incluem um eletrodo indicador, um eletrodo de referência e um dispositivo para medir o potencial.



Eletrodo de referência: são eletrodos cujo potencial é fixo e conhecido com exatidão. Indepe de da concentração do analito ou outros íons presentes na solução, permitindo, assim, medir as variações de potencial da outra semi-célula.

Eletrodo indicador: são eletrodos que respondem a mudanças na atividade do íon de interesse de forma rápida e seletiva. Desenvolvem um potencial E_{ind} proporcional à atividade do analito.

O potencial da célula (E_{cel}) é representado como:

$$E_{cel} = (E_{ind} - E_{ref}) + E_j$$

Como já se pode prever, não existem métodos para determinar o valor absoluto de potencial de um único eletrodo, já que todos medem a diferença de potencial. No entanto, isso não é um grande problema, já que é possível realizar medidas em função de um eletrodo de referência. O eletrodo de referência fornece um valor de potencial E_{ref} ao qual outros potenciais podem ser referidos em termo de uma diferença de potencial. Um bom eletrodo de referência obedece à equação de Nernst, tem potencial estável com o tempo e a temperatura e retorna ao potencial original após ser submetido à corrente. O primeiro a ser utilizado foi o eletrodo de hidrogênio, porém, por ser de difícil preparo, não é mais utilizado. Sua importância, hoje, é para definir a escala de potencial de eletrodo padrão, conhecida como EPH (eletrodo padrão de hidrogênio). Atualmente, os eletrodos de referência mais comuns são o de prata-cloreto de prata ou o de calometano.



O químico e físico alemão Walther Hermann Nernst (1864-1941), Prêmio Nobel de Química, em 1920, formulou a conhecida Equação de Nernst, a qual é amplamente utilizada em eletroquímica e pode ser expressa como:

$$E_{cel} = E^{\circ}_{cel} - (RT / nF) \ln Q$$

Para conhecer melhor essa equação e rever alguns conceitos muito importantes de eletroquímica, acesse o link a seguir: <<https://www.youtube.com/watch?v=wPVdad5aon4>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

Assim, a medida do E_{cel} permite encontrar a atividade da espécie iônica interessada, já que E_{ref} é conhecido. Entretanto, existe também o potencial da junção (E_j), que pode ser reduzido através do uso de ponte salinas (geralmente, cloreto de potássio ou de nitrato de potássio com concentração superior a 4 mol.L^{-1}). Para muitos métodos eletroanalíticos, o E_j é desprezível, entretanto, nos métodos potenciométricos, esse potencial pode limitar a precisão e exatidão das medidas.

Já conversamos anteriormente sobre os eletrodos de referência, e cabe aqui uma descrição sobre os eletrodos indicadores, que são de dois tipos:

- Indicadores metálicos: dependem da atividade da espécie iônica e o potencial surge da tendência de uma reação redox ocorrer na superfície do eletrodo. Eles podem ser de 1º classe, 2º classe, 3º classe ou redox.

- Indicadores de membrana: o potencial é semelhante ao E_j desenvolvido através da membrana semipermeável que separa as soluções dos analitos e do eletrodo de referência. O mais utilizado é o eletrodo de vidro medidor de pH, o qual veremos a seguir.

Já no início do século passado, foi observado que através de um bulbo formado por uma fina película de vidro ocorria condução elétrica entre duas soluções aquosas com acidez diferentes, uma no interior e outra no exterior do bulbo, e que a diferença de potencial dependeria da atividade dos íons H^+ nas duas soluções separadas pela membrana.



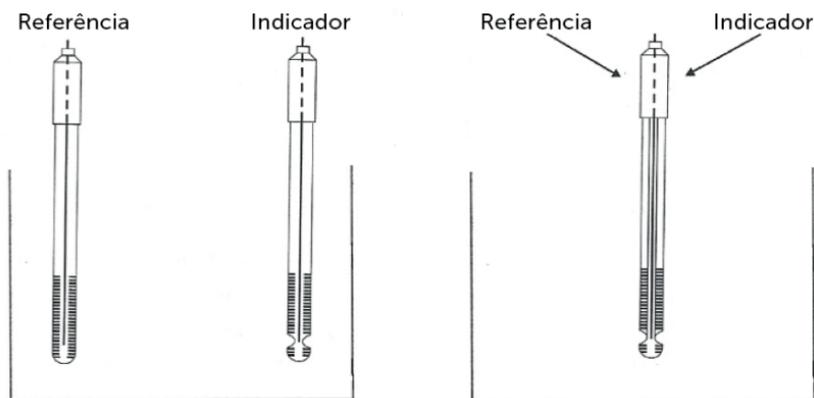
Refleta

Após uma série de medidas para verificar o pH de uma solução, o analista percebeu que a membrana de vidro estava recoberta de gordura. Você acredita que as medidas realizadas até agora são válidas? Por quê?

Os sistemas para medidas de pH podem ser:

- Simples: consistem em um eletrodo indicador de vidro (com um eletrodo de referência interno) e um eletrodo de referência imersos na solução na qual se deseja conhecer o pH. O eletrodo indicador consiste em uma fina membrana de vidro na forma de bulbo, sensível ao pH, que contém na sua parte interna uma solução de HCl diluído, saturado com NaCl (ou uma solução tampão) (Figura 1.11A).
- Combinado: nesse caso, tanto o eletrodo de vidro (com seu eletrodo de referência interno) quanto o eletrodo de referência externo estão dentro de um mesmo arranjo. O eletrodo de referência externo faz contato com a amostra através de uma junção de vidro ou outro material poroso (Figura 1.11B).

Figura 1.11 | Sistema típico de um eletrodo de vidro simples (A) e combinado (B)



Fonte: adaptada de Gil (2010).

Hoje, além dos eletrodos indicadores de pH, vários outros eletrodos de membrana são disponíveis comercialmente. Dentre eles, vale destacar, devido à sua importância na área farmacêutica, os eletrodos de cátions divalentes, já que são muito utilizados para análise de Ca^{++} , e os eletrodos íon-seletivos, utilizados em análises clínicas para determinação de valinomicina (eletrodo seletivo a K^{+}) e bio-tioureia (eletrodo seletivo a Cl^{-}). Vale ainda destacar os eletrodos de membrana desenvolvidos para responderem seletivamente a moléculas.

Entre eles, temos a sonda sensível a gás, que determina amônia ou dióxido de carbono, e o biossensor, o qual determina glicose e ureia utilizando como biossensores enzimas, DNA, antígenos, bactérias, células ou tecidos. A interação do analito com esse material dispara a produção de espécies que são monitoradas por meio de um eletrodo seletivo a moléculas ou íons.

Os equipamentos utilizados para as medidas potenciométricas diretas são conhecidos como pHmetros. Eles proporcionam medidas rápidas e simples, baseadas na equação de Nernst, necessitando somente da comparação entre o potencial imerso na amostra (E_{ind}) e do potencial desenvolvido pelo próprio eletrodo de referência (E_{ref}) imerso em uma ou mais soluções padrão do analito. A medida não é destrutiva, tem uma geometria que permite medir o pH de amostras muito pequenas e, geralmente, não necessita de nenhum tratamento da amostra, sendo que tanto soluções opacas como viscosas podem ser medidas. O circuito é calibrado com soluções tampão, estabelecendo-se uma faixa de trabalho entre 100 e 1400 mV, que corresponde à faixa de pH entre 1 e 14.

Para a quantificação, além da calibração com soluções tampões, podem-se utilizar curvas de calibração externa ou o método de adição padrão (mede o potencial antes e depois da adição de pequenos volumes de uma solução padrão sobre um volume conhecido da amostra). É extremamente importante ter cuidado com a calibração do eletrodo e a interpretação dos resultados quando medidas são feitas nos extremos da escala de pH (acima de 11 ou abaixo de 0,5), tendo em vista o afastamento da linearidade nesses extremos. Nesses pHs, as medidas só devem ser qualitativas.

Existem, ainda, as titulações potenciométricas, nas quais o eletrodo indicador serve para determinar o ponto final de uma titulação. No geral, são muito mais exatas e precisas do que os métodos que empregam indicadores visuais. São usadas para determinar ponto final de reações de neutralização, precipitação, formação de complexos e oxidação-redução. Hoje, existem instrumentos no mercado que realizam automaticamente tanto a adição do titulante como a determinação do ponto final.

Métodos eletrogravimétricos e coulométricos

A eletrogravimetria e a coulometria são métodos eletrolíticos quantitativos, ou seja, dependem de uma fonte externa de energia. Ocorre uma eletrólise por tempo suficiente para assegurar a oxidação ou redução completa do analito a um produto de composição conhecida. São métodos simples, sensíveis, exatos e precisos. Não requerem calibrações preliminares contra padrões químicos, porque a relação entre grandeza e concentração pode ser estipulada através da teoria e dos dados de massa atômica.



Assimile

Eletrogravimetria: determina a quantidade de analito presente por meio da sua conversão eletrolítica a um produto que é pesado na forma de um depósito sobre um dos eletrodos.

Coulometria: determina a quantidade de analito pela medida da quantidade de carga elétrica necessária para convertê-lo completamente a um dado produto.

Quando uma fonte externa de energia é colocada em uma célula eletroquímica, o potencial medido entre os dois eletrodos não corresponde mais simplesmente à diferença de potencial entre eles, ou seja, não pode ser descrito pela equação de Nernst, como na potenciometria. Dois fenômenos adicionais devem ser considerados nesses casos: a queda IR e a polarização. O primeiro ocorre porque células eletroquímicas resistem à passagem de corrente, o que pode ser calculado pela Lei de Ohm. Já a polarização refere-se ao desvio do potencial do(s) eletrodo(s) do valor previsto pela equação de Nernst sob a passagem de corrente. A polarização é influenciada pelo tamanho, forma e composição do eletrodo, composição da solução eletrolítica, temperatura e velocidade de agitação, nível de corrente e estado físico da espécie envolvida na reação da célula. Assim, devido a esses dois fatores, para gerar corrente em uma célula eletrolítica, é necessário aplicar potenciais superiores aos termodinâmicos (calculados pela equação de Nernst).

Os métodos eletrolíticos oferecem uma forma relativamente seletiva de separar espécies iônicas. Sua viabilidade e condições

teóricas para alcançar uma separação podem ser obtidas a partir dos potenciais padrão de eletrodos das espécies de interesse. Assim, é possível encontrar as diferenças de potenciais padrão de eletrodos necessárias para determinar um íon sem a interferência de outro.



Exemplificando

A eletrólise completa, seja por eletrogravimetria ou coulometria, é amplamente utilizada para produzir coberturas metálicas, como o recobrimento de talheres com a prata, ou de joias com algum metal precioso.

Nos métodos eletrogravimétricos, geralmente, o metal é depositado em um catodo de platina previamente pesado e o aumento da massa é determinado. Dois tipos de métodos existem:

- Eletrogravimetria sem controle de potencial: o potencial do eletrodo de trabalho (catodo) não é controlado, nesse caso, se utilizam equipamentos simples e de baixo custo. Geralmente, o eletrodo de trabalho tem uma área grande na forma de uma rede cilíndrica de platina e o eletrodo de referência (anodo) toma a forma de uma barra de agitação sólida de platina, que se localiza dentro do catodo e é conectada a ele por circuito externo. Idealmente, o metal depositado eletroliticamente deve ser fortemente aderente, denso e uniforme, para que possa ser lavado, seco e pesado sem perda mecânica ou reação com o ar. Bons depósitos metálicos são finamente granulados e têm brilho metálico. A aplicação prática limita-se à separação de cátions facilmente reduzíveis daqueles que são difíceis de serem reduzidos. Isso porque variações de corrente, a queda IR e o potencial do catodo durante a eletrólise variam durante a deposição, provocando a codeposição. Assim, o decréscimo de IR precisa ser suplantado por um aumento no potencial do catodo, dado que o potencial da célula é constante. Por exemplo, o cobre é depositado em 30 min e, enquanto o potencial aplicado no catodo é aumentado (para compensar a queda IR), outros metais começam a depositar nesse mesmo tempo, como ocorre com o chumbo, impedindo a quantificação correta do cobre.

- Eletrogravimetria com potencial controlado: para separar espécies com potenciais de eletrodo que diferem em apenas poucos décimos de volt, precisamos empregar técnicas mais sofisticadas, já que, como vimos, a polarização que ocorre no cátodo faz com que o potencial do eletrodo se torne tão negativo que a codeposição de outras espécies presentes se inicia antes do analito estar completamente depositado. Um grande deslocamento negativo no potencial do cátodo pode ser evitado pelo uso do sistema de três eletrodos ao invés do de dois eletrodos (eletrodo de referência, de trabalho e um contra-eletrodo). Nesse sistema, existem dois circuitos elétricos independentes que compartilham um eletrodo em comum, o eletrodo de trabalho. Um dos circuitos é o circuito de eletrólise e o outro é o circuito de controle. A resistência elétrica no circuito de controle é tão grande que o circuito de eletrólise fornece essencialmente toda a corrente para a eletrólise. O circuito de controle monitora continuamente a voltagem entre o eletrodo de trabalho e o de referência e mantém sob valor controlado. O eletrodo de trabalho (cátodo) consiste em uma malha cilíndrica metálica (geralmente, platina ou latão) e o contra-eletrodo (ânodo) gira de maneira a funcionar como um agitador mecânico. O uso de cátodo de mercúrio é particularmente útil para remover elementos facilmente reduzíveis em uma etapa preliminar de análise. É possível separar cobre, níquel e prata de íons, como alumínio, sulfatos e fosfatos. Os metais depositados se dissolvem no mercúrio para formar amálgamas, que são removidas da solução do analito. Vários metais podem ser determinados em misturas por deposições sucessivas dos metais em um cátodo de platina previamente pesado. Após cada deposição, o cátodo é pesado e retorna para a solução. A cada vez um potencial mais negativo é aplicado (-0,2, -0,4, -0,6 V) e novas deposições vão ocorrendo. Aqui, uma desvantagem é o tempo necessário para a lavagem, secagem e pesagem dos eletrodos.

Por fim, trataremos dos métodos coulométricos. Abrangem um conjunto de métodos que envolvem medidas de quantidade de eletricidade (em Coulombs) necessária para converter quantitativamente um analito a um diferente estado de oxidação. Assim como nos métodos gravimétricos, têm a vantagem de que a constante entre quantidade medida e massa do analito pode ser calculada através de constantes físicas conhecidas, não

necessitando de padrões para calibração. Existem dois tipos de métodos coulométricos:

- Coulometria de potencial controlado: semelhante aos gravimétricos de potencial controlado. O potencial do eletrodo de trabalho é mantido constante em relação ao de referência, em um valor onde ocorre a oxidação ou redução quantitativa do analito, sem o envolvimento de outras espécies menos reativas presentes na amostra ou solvente. Apresenta as mesmas vantagens dos métodos eletrogravimétricos, com o diferencial de que não é necessário pesar o produto. A instrumentação para coulometria potenciostática consiste em uma célula de eletrólise, um potenciostato e um integrador para determinar a carga consumida. O método, hoje, é aplicado para determinar mais de 50 elementos em compostos inorgânicos, e tem sido muito usada no campo da energia nuclear para determinar urânio e plutônio livre de interferências. Também, é usada para determinação eletrolítica (e síntese) de compostos orgânicos, como ácido tricloroacético e pícrico. Outra aplicação é como detector em cromatografia líquida.

- Coulometria de corrente controlada (titulações coulométricas): emprega uma corrente constante que produz eletroliticamente o titulante, a qual passa através da célula até um sinal indicar uma reação completa. A quantidade de carga necessária para alcançar o ponto final é calculada pela magnitude da corrente e pelo tempo gasto.

Nos dois casos, o analito precisa reagir com 100% de eficiência da corrente. A eficiência de 100% não implica que o analito deve participar diretamente do processo de transferência de elétrons com o eletrodo, podendo participar em uma reação secundária àquela que ocorre no eletrodo. Em alguns casos, é adicionado outro reagente que finaliza a reação de oxidação com 100% de eficiência de corrente.

Alguns dos instrumentos comerciais são usados para determinar várias espécies, já outros são projetados para somente um tipo de análise, como os tituladores de cloreto (nos quais íons prata são coulometricamente gerados), monitoramento de dióxido de enxofre, dióxido de carbono e titulação de água (reagente de Karl Fisher é eletroliticamente gerado).

Sem medo de errar

Nesta última seção da Unidade 1, enquanto aguarda o resultado do laboratório acreditado pelo INMETRO, o produtor de cachaças João Pedro volta a verificar os laudos dos dois laboratórios contratados anteriormente e percebe que métodos diferentes foram utilizados pelos dois laboratórios. O laboratório MetalLabor utilizou a Potenciometria com eletrodo íon seletivo de cobre, enquanto que o laboratório LabSulTox utilizou a Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Diante dessa constatação e considerando o que vimos até agora nesta disciplina, podemos resolver as duas questões apresentadas:

1. Quais são as principais características de cada uma das duas técnicas?
2. Você considera que as duas foram apropriadas para a medição do cobre?

Apesar de ainda não termos estudado a Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, que será vista em detalhes na Unidade 3, tivemos uma breve introdução à técnica na Seção 1.1 desta Unidade, quando vimos que se trata de uma técnica instrumental que mede a propriedade de absorção da radiação eletromagnética. Além disso, pelo nome da técnica é possível observar que se trata de absorção atômica, e não de absorção molecular.

No nosso caso, como precisamos determinar cobre na amostra, podemos concluir, mesmo sem muito conhecimento, que essa técnica é apropriada para medir cobre na amostra. Veremos, na Unidade 3, que essa técnica é bastante utilizada para a determinação de cobre e outros metais em uma infinidade de matrizes diferentes, e que é possível atingir limites de quantificação muito baixos com essa técnica.

Em relação à técnica potenciométrica utilizada, considerando o que estudamos nesta seção, você pode responder com bastante propriedade às duas questões anteriores.

Além delas, segue mais uma questão: o tipo de eletrodo selecionado foi a melhor opção para esse caso?

Como vimos, o surgimento dos eletrodos de íons seletivos foi

uma grande revolução que iniciou com os eletrodos seletivos a H^+ e se estendeu para outros cátions e ânions.

Hoje, existem comercialmente eletrodos seletivos a F^- , Cl^- , Br^- , I^- , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , entre outros. Para que sejam seletivos, uma membrana ou espécie contida dentro da matriz da membrana deve ser capaz de ligar-se de forma seletiva ao analito.

Assim, levando-se em conta que a potenciometria utiliza instrumentação mais simples e de custo menor que os métodos espectrométricos, além de dispensar o uso de solventes orgânicos, ela pode ser utilizada para determinação de cobre em amostras de cachaça. No entanto, um detalhe importante das análises eletroquímicas é que elas são específicas para um estado particular de oxidação, sendo assim, para que a análise esteja correta, é necessário garantir que todo o cobre presente na amostra esteja na forma de Cu^{2+} . Esse “pequeno detalhe”, bem como outros já citados nas seções anteriores, podem ser as causas dessa grande diferença nos resultados.

Finalizamos a Unidade 1 sem saber se a quantidade de cobre presente nas amostras de cachaça estava ou não dentro do limite de aceitável de 2 mg.L^{-1} exigido para exportar para alguns países. O senhor João Pedro recebeu, nesta semana, o resultado do laboratório acreditado e o resultado médio obtido foi de $1,71\text{ mg.L}^{-1}$, com um desvio padrão de $0,06\text{ mg.L}^{-1}$, representando um coeficiente de variação de 3,51% entre as cinco replicatas analisadas. Resultado muito mais completo do que os anteriores, concorda?

Com esse resultado, ele finalmente está seguro para dar continuidade ao seu sonho de expandir seus negócios.

Avançando na prática

Determinação de ácido acético no vinagre

Descrição da situação-problema

O ácido acético é um líquido incolor de aroma irritante e penetrante e sabor azedo, que é quimicamente denominado de ácido etanoico (CH_3COOH) e pertence ao grupo orgânico dos ácidos carboxílicos. Ele é o principal constituinte do vinagre, que

é uma solução aquosa que deve conter de 4 a 10% em massa de ácido acético.

Certo analista precisava realizar a determinação de ácido acético em uma amostra de vinagre comercial. Para isso, optou pela titulação potenciométrica. Transferiu 20,0 mL de vinagre para um béquer e diluiu com 40,0 mL de água destilada. Realizou a calibração do pHmetro e mergulhou o eletrodo na solução preparada junto a uma barra magnética. Em seguida, encheu uma bureta com 50,0 mL de NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, preparou o sistema de titulação e ligou o agitador magnético. Abriu a bureta e iniciou a titulação, anotando o potencial medido a cada 1,0 mL até observar uma mudança brusca de pH com 31 mL de titulante, conforme tabela a seguir, na qual são apresentados os dados a partir da adição de 20,0 mL do titulante:

pH medido	Volume de NaOH (mL)	pH medido	Volume de NaOH (mL)
5,21	20	5,91	25
5,27	21	6,24	26
5,38	22	10,92	27
5,51	23	11,46	28
5,63	24	11,74	29

Considerando a estequiometria 1:1, ou seja, n° de mols (N) de $\text{CH}_3\text{COOH} = n^\circ$ de mols de NaOH, calcule a se porcentagem (%) de ácido acético no vinagre analisado está dentro do recomendado.

Resolução da situação-problema

Considerando que $N = \frac{m}{MM}$ e $N = C.V$, calculamos a massa (m) de ácido acético presente nos 20 mL de vinagre, que foi de 0,81 g. Considerando que a densidade do vinagre é de $1,05 \text{ g.mL}^{-1}$ e aplicando $d = \frac{m}{V}$, a massa de vinagre é de 21 g. Por fim, encontramos a porcentagem (%) de ácido acético na amostra, que é de 3,857%. Como esse resultado está fora da especificação, esse produto não pode ser classificado como vinagre.

Agora, refaça os cálculos e verifique se o resultado apresentado está correto.

Faça valer a pena

1. Eletrodos são condutores metálicos conectados externamente e que são imersos na solução, cuja atividade se deseja conhecer. A respeito dos eletrodos utilizados na potenciometria, julgue as afirmações a seguir:

- I. Eletrodos de referência têm potencial fixo e conhecido com exatidão.
- II. Eletrodos indicadores respondem a mudanças na atividade do íon de interesse.
- III. Eletrodos indicadores obedecem à equação de Nernst.
- IV. O eletrodo de prata-cloreto de prata é um exemplo de eletrodo de referência.
- V. O eletrodo de vidro medidor de pH e o eletrodo de calometano são exemplos de eletrodos indicadores.

Identificando as afirmações como verdadeiras (V) ou falsas (F), a sequência correta é:

- a) V – V – V – F – V.
- b) V – F – F – V – V.
- c) V – V – F – V – F.
- d) F – V – F – V – V.
- e) F – F – V – F – F.

2. A estatueta do Oscar é um prêmio oferecido anualmente aos premiados pela Academia de Cinema de Hollywood. Ele mede em torno de 35 cm e pesa, aproximadamente, 4 kg. Ela é feita à mão em um molde de aço. O molde é recoberto eletroliticamente com cobre e, em seguida, com níquel. A estatueta recebe um banho de prata e, após polimento, é finalmente recoberta eletroliticamente com ouro 24 quilates. A quantidade de ouro depositada em cada estatueta pode ser determinada pesando-se a estatueta antes e após a etapa final de eletrólise.

As etapas de eletrólise aqui descritas dizem respeito a qual técnica analítica?

- a) Eletrogravimetria com potencial controlado.
- b) Coulometria com corrente controlada.
- c) Potenciometria direta.
- d) Titulação potenciométrica.
- e) Coulometria com potencial controlado.

3. O método de Karl Fisher é de grande utilidade para determinar _____ de amostras de alimentos, petróleo, dentre outras diluídas, geralmente, em metanol. Instrumentos automáticos ou semiautomáticos baseados na _____ são os mais utilizados para essa medida. Nesse caso, dois eletrodos indicam seu ponto final por meio do aparecimento de uma _____ causada pelo iodo não mais consumido na reação.

Complete as lacunas da sentença acima:

Assinale a alternativa correta:

- a) Umidade – titulação potenciométrica – corrente.
- b) pH – titulação potenciométrica – diferença de potencial.
- c) pH – eletrogravimetria – diferença de potencial.
- d) Umidade – titulação coulométrica – corrente.
- e) Ácidos orgânicos – titulação coulométrica – diferença de potencial.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p. Disponível em: <<http://www.smarnet.com.br/qualidade/metrologia/17025.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010**. Dispõe Sobre As Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, 16 abr. 2010.

FERNANDES, Dhion Meyg da Silva. **Relatório TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA**: Determinação da Percentagem de Ácido acético no Vinagre. 2014. Disponível em: <http://www.academia.edu/8843521/TITULAÇÃO_POTENCIOMÉTRICA_Determinação_da_Percentagem_de_Ácido_acético_no_Vinagre>. Acesso em: 4 abr. 2017.

GIL, Eric de Souza et al. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511p.

HOLLER, F. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução: Célio Pasquini e colaboradores. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055p.

LEITE, Flávio. **Validação em Análise Química**. 4. ed. Campinas: Atomo, 2002. 278p.

MEGAQUÍMICA. **Células Eletroquímicas e a Equação de Nernst**. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=wPVdad5aon4>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

RATH, Susanne; ORLANDO, Ricardo Mathias. **Novo sistema para extração em fase sólida**. Produção: Agência INOVA Unicamp. Realização: RTV Unicamp. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=V7l6OEFuL-o>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

RIBANI, Marcelo et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol27No5_771_16-RV03165.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2017.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução de Robson Mendes Matos. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 950p.

SOARES, Lucia Valente. **Curso básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 337p.

Métodos cromatográficos

Convite ao estudo

Caro aluno, espero que, assim como eu, você tenha compreendido a importância do assunto que temos desenvolvido nesta disciplina para a sua formação profissional. Nesta unidade 2, a qual iniciaremos hoje, estudaremos com detalhes as técnicas cromatográficas. Elas, provavelmente, são as mais utilizadas no mundo para a quantificação de compostos orgânicos em medicamentos, alimentos, cosméticos, fluidos biológicos, saneantes, dentre uma infinidade de matrizes diferentes.

O contexto de aprendizagem desta unidade foi elaborado para que possamos discutir uma questão muito presente no mundo esportivo: o doping. O doping pode ser definido como o uso de substâncias potencialmente perigosas à saúde do atleta e/ou capazes de aumentar o seu desempenho durante uma competição. Muitas vezes, a necessidade de vencer a todo custo, conjugada com a pressão externa exercida pela mídia, empresários, treinadores, clubes ou familiares, fazem com que o atleta recorra ao uso de substâncias proibidas. Entre elas, temos estimulantes, analgésicos narcóticos, corticoesteroides, β -bloqueadores, β -agonistas e os esteroides anabolizantes, dentre outras classes farmacêuticas, sendo esses últimos os mais perigosos, devido aos efeitos colaterais gravíssimos, ao vício e à síndrome da abstinência.

Os exames antidoping em atletas olímpicos são realizados nos laboratórios credenciados pela *World Antidoping Agency* (WADA). Para as análises, são coletadas amostras de sangue ou urina ao término de prova ou em qualquer momento da

vida ativa do atleta nas competições. Um dos casos mais famosos de doping foi o do canadense Ben Johnson. Ele impressionou o mundo nas Olimpíadas de Seul, em 1988, sendo o primeiro a terminar os 100 m rasos abaixo da marca de 9s80. No entanto, 48 horas após o ouro, o resultado do exame antidoping deu positivo para o esteroide anabolizante estanozolol. Além de perder a medalha, ele teve que cumprir dois anos de suspensão.

Para a realização dessas análises, cromatógrafos líquidos e gasosos, geralmente acoplados a espectrometria de massas, são os mais utilizados. Mas qual é o mais adequado para cada composto? Existe um cromatógrafo ideal, capaz de resolver todos os problemas? O preparo da amostra pode ser o mesmo independente do equipamento? E quanto aos limites de quantificação necessários?

Nosso objetivo, no decorrer desta unidade, é buscarmos respostas para esses questionamentos. Na seção 2.1, conheceremos os fundamentos da cromatografia, os mecanismos de separação e os tipos existentes. Nas seções 2.2 e 2.3, falaremos especificamente sobre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (GC), que são as duas principais técnicas cromatográficas na atualidade.

Estão prontos? Bons estudos!

Seção 2.1

Introdução às separações cromatográficas

Diálogo aberto

Prezado aluno, esta Seção 2.1 nos proporcionará conhecimentos sólidos e essenciais que serão a base para compreendermos as duas próximas seções, as quais tratarão das técnicas cromatográficas instrumentais.

Então, vamos direto ao assunto doping, que nos foi proposto no *Convite ao estudo* e nos acompanhará no decorrer desta unidade.

A situação-problema que avaliaremos nesta seção está descrita a seguir:

Luis é o farmacêutico responsável de um laboratório recém-credenciado pela WADA para a realização de exames antidoping em atletas olímpicos. Ele foi o responsável pela aquisição de muitos equipamentos e por conduzir a validação de dezenas de métodos no decorrer dos últimos cinco anos de forma a abranger grande parte das substâncias proibidas listadas pela WADA. Em decorrência do seu trabalho exemplar à frente deste laboratório, ele foi convidado a participar de um evento internacional realizado em Nairóbi, na Etiópia, sobre o desenvolvimento dos laboratórios químicos daquela região e da capacitação deles para análise de substâncias proibidas. Após a sua palestra, um representante do governo do Quênia o questionou sobre a dificuldade financeira desses laboratórios e sobre a possibilidade do uso de técnicas mais simples, como a Cromatografia em Camada Delgada, para a análise de cafeína, efedrina e anfetaminas no sangue ou urina.

Se você fosse o Luís, qual seria a sua resposta?

Para responder a essa questão, precisamos conhecer a fundo o princípio que envolve as principais técnicas cromatográficas, bem como suas aplicações e limitações.

Por isso, vamos iniciar logo esta seção?

Não pode faltar

Nas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, análises ambientais e forenses, entre outras, frequentemente, é necessário separar, isolar, purificar, identificar e quantificar os componentes de misturas, muitas vezes, bastante complexas. Assim, quanto mais pura e homogênea for a substância a ser analisada, menores serão as probabilidades de erro na sua identificação e quantificação.

A partir do início do século XX, a cromatografia tem assumido um papel de protagonista na separação de componentes de uma mistura. Versatilidade, rapidez, precisão, baixo custo, robustez e flexibilidade são apenas algumas das qualidades desta técnica analítica que, atualmente, se faz presente em qualquer processo de separação analítica.

Ela foi desenvolvida pelo botânico russo M. Tswett (1872-1919) para a separação de clorofilas e xantofilas de plantas através da passagem de soluções de amostras de plantas por uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio. As substâncias separadas apareciam como bandas coloridas nas colunas, o que o ajudou a nomear a técnica como cromatografia (em grego, *chroma* = cor e *graphein* = escrita). O impacto tremendo desses métodos na ciência é comprovado pelo Prêmio Nobel de Química de 1952 para A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, pela descoberta da cromatografia de partição. Muitos outros prêmios foram concedidos a partir de então para trabalhos baseados na cromatografia.

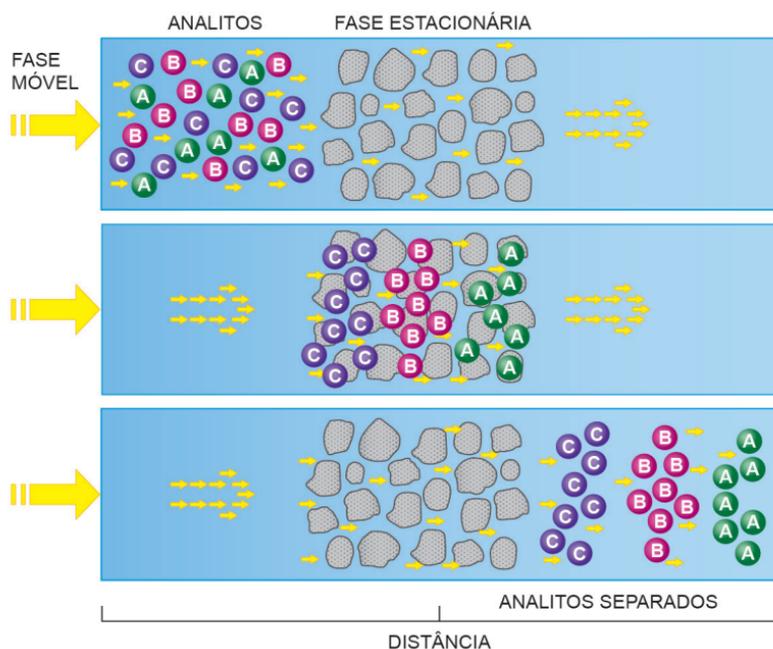


Assimile

Cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, no qual esses componentes são distribuídos entre duas fases, uma que permanece "estacionária" e outra "móvel" que percorre através da primeira, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes desses componentes.

O objetivo da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias, seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases, a fase móvel (FM) e a fase estacionária (FE). Os componentes que ficam retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente, e os componentes que interagem menos com a FE movem-se (ou eluem) mais rapidamente na FM. Assim se dá a separação cromatográfica (Figura 2.1).

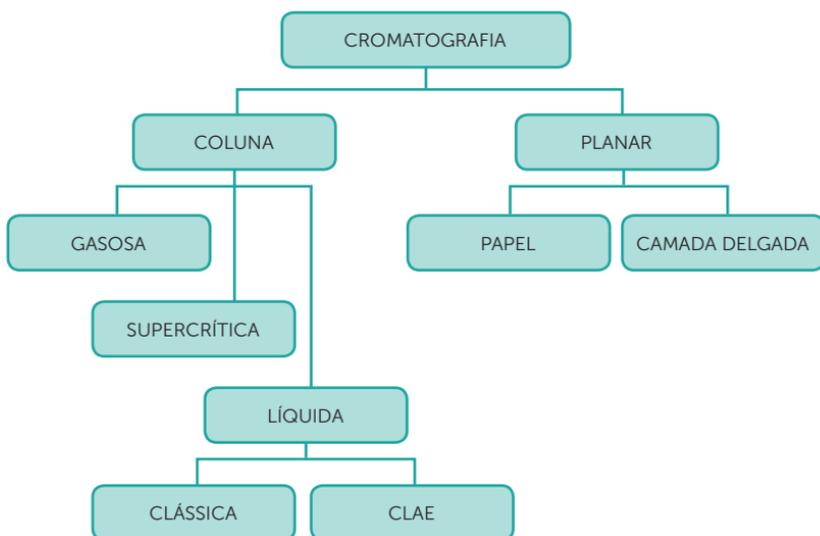
Figura 2.1 | Princípio da separação cromatográfica



Fonte: adaptada de Gil (2010).

Vários critérios são usados para classificar as diferentes modalidades de cromatografia, sendo que uma das mais utilizadas é a classificação pela forma física das fases, ou seja, a FE disposta na forma de uma coluna ou de um plano, e a FM podendo ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico (Figura 2.2).

Figura 2.2 | Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com a forma física das fases



Fonte: elaborada pela autora.

Outra classificação extremamente importante baseia-se no mecanismo de separação dos compostos, ou seja, no tipo de interação entre o analito e a fase estacionária. A separação pode ser por processos físicos (adsorção ou partição), químicos (troca iônica e bioafinidade) ou mecânicos (exclusão).

- Cromatografia por adsorção: os analitos são adsorvidos temporariamente na superfície da FE sólida devido à presença de grupamentos ativos em sua superfície. Por causa da diferente polaridade dos analitos, alguns ficarão mais tempo retidos, enquanto outros serão facilmente desorvidos e eluídos com a FM. A FE é um sólido, geralmente constituída de alumina (óxido de alumínio) ou sílica, ambos altamente polares, e a FM é um líquido (ou um gás, menos comum). Em decorrência disso, analitos mais polares ficarão mais tempo retidos e, por isso, fases móveis mais polares precisarão ser empregadas para deslocá-los da FE (Figura 2.3a). Exemplos desse tipo de cromatografia incluem a Cromatografia em Coluna Aberta e a Cromatografia em Camada Delgada, as quais serão estudadas ainda nesta seção.

- Cromatografia por partição: neste mecanismo de separação, temos uma FM líquida e uma FE também líquida, sendo que elas devem ser imiscíveis, ou seja, uma deve ser polar e a outra apolar. A diferença de solubilidade do analito nas duas fases líquidas imiscíveis é o que promove a separação. Um material sólido e inerte serve de suporte para a FE líquida, como no caso da Cromatografia em Papel, em que a celulose serve de suporte para a FE líquida que percorrerá através dela (Figura 2.3b).

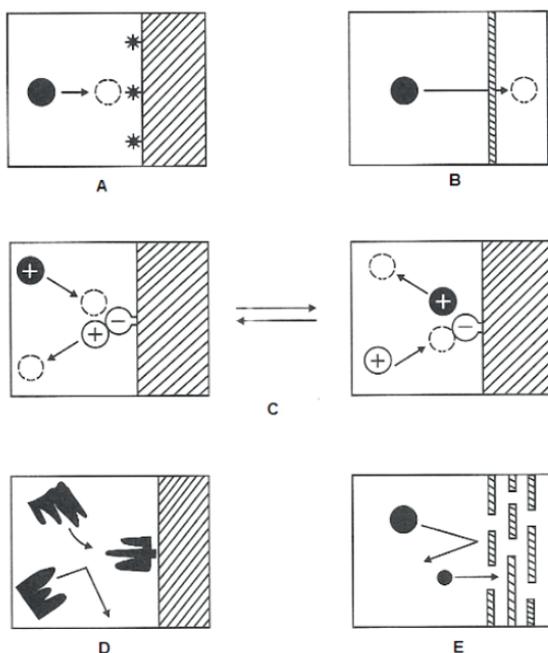
- Cromatografia por troca iônica: no processo de troca iônica, a FE é constituída de um suporte no qual são adicionados grupos ionizáveis, funcionando como trocadores aniônicos (com sítios carregados positivamente, retendo ânions) ou trocadores catiônicos (com sítios carregados negativamente, retendo cátions). A FM também é uma solução iônica carregada de acordo com o tipo de trocador usado, e é trocada durante a separação para proporcionar uma força iônica capaz de eluir os componentes iônicos da amostra (Figura 2.3c). Proteínas, aminoácidos, aminas ou ácidos carboxílicos, por serem compostos ionizáveis, geralmente, são separados por esse tipo de cromatografia.

- Cromatografia por bioafinidade: grupos com especificidade biológica (por exemplo, antígeno e substratos) são ligados a um suporte e funcionam como FE. Eles são específicos para seus componentes complementares, como anticorpos ou enzimas, deixando passar outras espécies presentes na amostra. Para a eluição dos compostos é necessária uma alteração nas propriedades da fase móvel (como alteração no pH ou na força iônica) de forma que ocorra a modificação do grupo ligado ao suporte ou do componente retido. É uma técnica importante para o isolamento de substâncias, atingindo alto grau de pureza dos compostos isolados, como proteínas, enzimas, glicoproteínas, entre outras aplicações.

- Cromatografia por exclusão: também conhecida como filtração em gel ou permeação em gel, trata-se de um processo mecânico de separação de compostos baseado na diferença de massa molecular e na conformação espacial dos compostos a serem separados. Polímeros porosos inertes são utilizados como FE, sendo que moléculas maiores não são capazes de penetrá-las eluindo mais rapidamente do que as moléculas menores (Figura

2.3e). Suas principais aplicações são no fracionamento de proteína e polissacarídeos e na etapa de purificação de extratos de amostras.

Figura 2.3 | Mecanismos de separação cromatográficos



Fonte: Collins, Braga e Bonato (2006).



Assimile

A cromatografia também pode ser classificada de acordo com a polaridade das FM e FE:

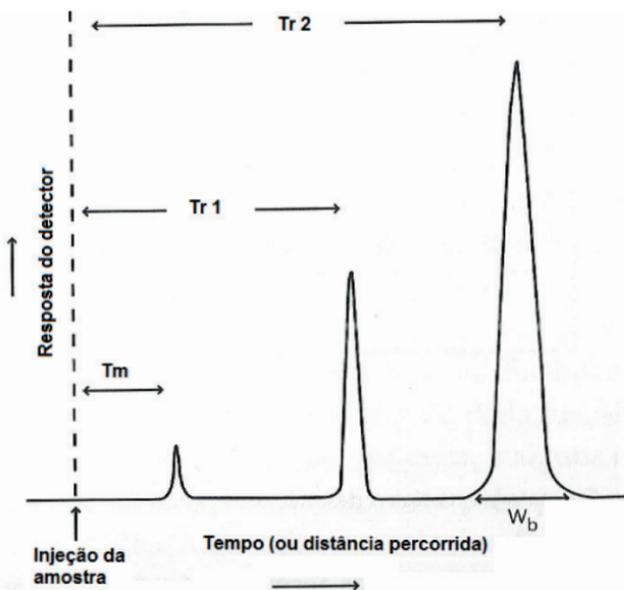
- Cromatografia de fase normal: a FE é polar e a FM é relativamente apolar.
- Cromatografia de fase reversa: a FE é apolar e a FM é relativamente polar.

Para darmos prosseguimento no assunto, a definição de alguns termos se faz importante, já que serão utilizados para a identificação dos compostos separados, para avaliar o desempenho

chromatográfico e para auxiliar na otimização do processo de separação.

- Tempo de retenção (T_r): tempo decorrido do instante em que a amostra foi introduzida no sistema cromatográfico até o instante do registro do ponto máximo do pico do composto de interesse, conforme Figura 2.4. Engloba todo o tempo que o componente fica retido no sistema cromatográfico, quer na FM, quer na FE. Quando estamos falando de cromatografia planar, o termo mais correto é distância percorrida, ao invés de tempo de retenção, já que é possível realizar a medida da distância no plano.

Figura 2.4 | Cromatograma típico de uma cromatografia por coluna



Fonte: Collins, Braga e Bonato (2006).

- Tempo morto (T_m): tempo para que um composto não retido seja detectado (também, serve para medir o tempo de migração da fase móvel).

- Tempo de retenção ajustado (T'_r): tempo que o soluto fica retido na FE. Para isso, o T_m é subtraído do T_r , ou seja, $T'_r = T_r - T_m$.

- Fator de retenção (k): razão entre o T'_r e o T_m .

- Fator de separação (α): razão entre os tempos de retenção

ajustados de dois picos adjacentes. Assim, mede a capacidade de separar picos consecutivos.

- Resolução (Rs): mostra o quanto duas bandas (ou picos) estão distantes uma da outra em comparação às suas larguras (W). Indica a capacidade do sistema de produzir picos separados, simétricos e finos, ou seja, resolvidos. É dada pela fórmula $R_s = 2 (Tr_2 - Tr_1) / (Wb_1 + Wb_2)$. A maioria dos livros ou guias determina que o Rs deve ser maior que 1,5 ou 2,0, indicando a resolução completa de dois picos adjacentes.

- Eficiência: é o parâmetro que mais precisamente define a qualidade de um sistema cromatográfico. É dado pelo número de pratos (N) ou pela altura dos pratos (H). Essas medidas dizem respeito à largura do pico (na sua base ou 1/2 altura) em relação ao seu Tr. No caso de realizar a medida considerando a largura da base do pico (Wb), a fórmula utilizada é $N = 16(Tr / Wb)^2$. Obviamente, quanto maior o N, maior a eficiência da coluna. Esse parâmetro é muito utilizado pelos fabricantes de coluna, pois é útil na comparação entre diferentes colunas.

- Alargamento de banda: é o alargamento do pico e pode ocorrer por fatores extracoluna (comprimento das conexões, por exemplo) ou por fatores da coluna, caracterizando, neste último caso, em uma perda de eficiência da coluna.



Pesquise mais

Van Deemter e seus colaboradores foram os primeiros a teorizarem sobre o assunto "alargamento de banda" em 1950, dando origem à conhecida Equação de Van Deemter.

Conheça e compreenda essa equação lendo o capítulo 26 - Introdução às separações cromatográficas, do livro *Princípios de Análise Instrumental*.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução: Célio Pasquini e colaboradores. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055p.

Agora que conhecemos alguns princípios básicos que regem qualquer separação cromatográfica, vamos nos deter aos três métodos cromatográficos clássicos: a Cromatografia em Papel, a Cromatografia em Camada Delgada e a Cromatografia em Coluna.

A Cromatografia em Papel (CP) é uma técnica simples, que utiliza pequena quantidade de amostra, apresenta boa capacidade de resolução e é utilizada na separação e identificação de compostos polares. Trata-se de um tipo de cromatografia por partição, como já vimos anteriormente, ou seja, tanto FM como FE são líquidas.



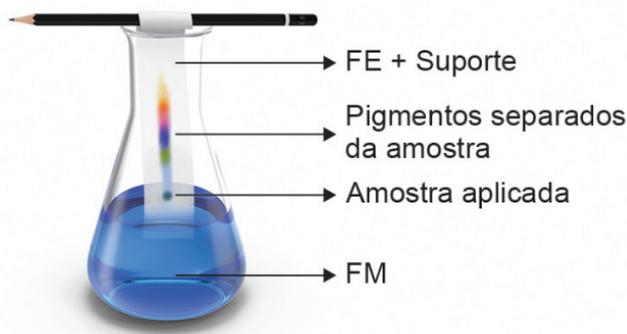
Refleta

Se na Cromatografia em Papel tanto a FE como a FM são líquidas, qual é a finalidade do papel e por que a cromatografia recebe esse nome?

Os compostos menos solúveis na FE se movimentam mais rapidamente ao longo do papel, enquanto os mais solúveis na FE ficam mais retidos, se movimentando mais lentamente. É importante lembrar que o papel (celulose) funciona como suporte da FE líquida. A FE, geralmente, é água que se liga à celulose através de ligações de hidrogênio.

É uma técnica muito utilizada para análises qualitativas de compostos que apresentam cores, através da comparação entre as manchas produzidas no papel por uma amostra desconhecida e por um padrão. A forma mais comum é a cromatografia ascendente, ou seja, o papel (suporte) contendo uma pequena quantidade da amostra é colocado dentro de uma cuba contendo a FM e essa sobe por capilaridade, separando os compostos, conforme demonstrado na Figura 2.5.

Figura 2.5 | Separação de uma amostra por Cromatografia em Papel



Fonte: adaptada de Educador Brasil Escola.

Quando a FM chega próxima ao fim do papel, retira-se o papel da cuba e seca-se o papel até eliminar toda a FM. Se os componentes que se desejam conhecer são coloridos, já é possível realizar a identificação através da comparação com padrões (padrões não representados na Figura 2.5).

Algumas dicas práticas para esse tipo de cromatografia incluem aplicar um volume pequeno de amostra no papel, com o auxílio de uma seringa ou capilar, de forma a ter uma mancha pequena e concentrada. Também, diluir a amostra em um solvente volátil e ter amostra e padrão em concentrações próximas. É sempre aconselhável aplicar padrão e amostra, lado a lado, no papel, para facilitar a visualização e dar igualdade de condições de separação. A análise qualitativa é realizada em termos de Fator de Retenção (R_f), ou seja, a razão entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela FM. Para uma análise quantitativa, pode-se aplicar várias concentrações de padrões no papel e comparar a intensidade da cor da amostra com a dos padrões. Outras formas são cortar e pesar a mancha do composto no papel, realizar uma análise densitométrica, ou ainda extrair a substância do papel e analisá-la por outro método.

Sua utilização na área farmacêutica está na separação e identificação de compostos polares e substâncias hidrófilas, como antibióticos hidrossolúveis e ácidos orgânicos, acompanhamento da sequência de uma reação química e o controle de qualidade de compostos radiomarcados.

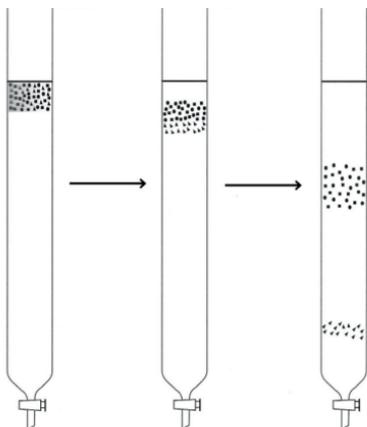
Na Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a separação cromatográfica é regida pelo processo da adsorção. A separação, geralmente, também se dá de forma ascendente, mas aqui a FE é uma camada delgada de um adsorvente retido em uma superfície plana. É uma técnica muito utilizada, pois, além de ser de fácil execução e baixo custo, é muito versátil, como veremos a seguir.

As FE mais comuns na CCD são a sílica (SiO_2), a alumina (Al_2O_3) e o florisil (silicato de magnésio). As placas podem ser adquiridas prontas no mercado, ou preparadas no próprio laboratório através de técnicas específicas para a deposição do adsorvente sobre a placa de vidro. A seleção da FM a ser utilizada na separação deve ser realizada com cuidado, já que poderá existir uma competição entre moléculas da FM e da amostra pelo adsorvente.

As mesmas dicas práticas citadas na CP relativas à aplicação da amostra, bem como à forma de desenvolvimento do cromatograma, também são válidas aqui. No caso de substâncias incolores, são utilizados reveladores, como vapores de iodo ou ácido sulfúrico, que as tornam visíveis ou fluorescentes. As análises quali e quantitativas são realizadas da mesma forma que a CP. Apesar de existirem diversas fases móveis e estacionárias disponíveis, diferentes técnicas de desenvolvimento e visualização, rápida execução e repetibilidade, é uma das técnicas mais difundidas em laboratórios químicos, farmacêuticos, biológicos, entre outros.

A Cromatografia em Coluna (CC) consiste em uma coluna de vidro vertical recheada com um sólido (FE), através da qual amostra e FM são percoladas e os componentes da amostra são separados (Figura 2.6). É uma excelente técnica preparativa, já que é possível coletar as diferentes frações que são eluídas da coluna. Os adsorventes são os mesmos empregados na CCD, além do silicato de magnésio (florisil) e do carvão ativado, sendo que os compostos eluirão de acordo com a sua polaridade.

Figura 2.6 | Eluição de uma mistura por Cromatografia em Coluna



Fonte: adaptada de Collins, Braga e Bonato (2006).



Exemplificando

Um exemplo da utilização da Cromatografia em Coluna, na indústria farmacêutica, é na separação e purificação de princípios ativos em larga escala. Após o processo de purificação finalizado, várias impurezas advindas da síntese ou do produto natural ficam retidas na coluna ou são eluídas antes do ativo. Essa é uma forma barata e, muitas vezes, escolhida em detrimento da partição por solventes ou destilação fracionada.

É uma técnica utilizada em várias áreas de pesquisa, por exemplo, na separação e purificação de materiais obtidos por síntese orgânica, separação e purificação de extratos vegetais, e na separação de esteroides de urina ou sangue em laboratórios de análises clínicas.

Sem medo de errar

Prezado aluno, no *Convite ao estudo*, conversamos um pouco sobre o problema do doping, muito comum em competições esportivas ao redor do mundo. A situação-problema que foi apresentada nos convida a nos colocarmos no lugar de Luis,

um experiente farmacêutico responsável por um laboratório credenciado pela *World Antidoping Agency* (WADA) para a realização de exames antidoping em atletas olímpicos.

Durante uma palestra ministrada por ele, em Nairóbi, no Quênia, Luis foi questionado sobre a possibilidade de utilizar técnicas como a Cromatografia em Camada Delgada para a análise de cafeína, efedrina e anfetaminas no sangue ou urina, já que equipamentos mais modernos são caros e com alto custo de manutenção.

Se você fosse Luís, qual seria a sua resposta?

Certamente, uma das primeiras questões a serem levantadas para poder sugerir uma técnica mais adequada é: quais são as concentrações dessas substâncias que precisarão ser determinadas nessas amostras? Só respondendo a essa pergunta podemos saber o quão sensível deverá ser a técnica de análise escolhida.

Quando falamos em doping, não estamos falando em concentração máxima permitida de determinada substância, seja na urina ou no sangue. Estamos falando de proibição total da substância. E baseado em tudo que vimos até agora, como é possível garantir que não existe absolutamente nada de uma substância em uma amostra? Infelizmente, não temos como garantir isso, mesmo utilizando a técnica mais sofisticada existente, porque todas têm uma limitação em relação ao seu limite de detecção. Claro que, hoje, temos disponíveis técnicas que permitem identificar fentogramas (10^{-15} gramas) de um composto, como a cromatografia acoplada à espectrometria de massas (que veremos mais adiante). Mas, e abaixo disso?

Assim, desta primeira discussão podemos concluir que, quando tratamos com substâncias proibidas, precisamos dos equipamentos mais sensíveis possíveis, os quais, via de regra, correspondem aos mais caros.

Em seguida, devemos pensar nas características da Cromatografia em Camada Delgada. Como vimos, ela pode ser utilizada para substâncias incolores, como é o caso das substâncias supracitadas, desde que seja utilizado algum tipo de revelador, assim isso não seria um problema. Vimos também que pode ser usada tanto para identificação como para quantificação, desde que sejam usados padrões para comparação e que os resultados são repetitivos geralmente. Dessa forma, a técnica não é limitada para a

determinação desses compostos em termos de características físico-químicas. Também, não é limitada em termos de características da amostra, já que vários adsorventes e solventes podem ser usados como FE e FM, respectivamente, de forma a permitir a análise de amostras bastante complexas, como sangue e urina.

No entanto, o que limita a técnica é a sensibilidade dela. Atualmente, ela tem sua maior utilização nos laboratórios para análise preparativa, ou seja, para a limpeza de um extrato, para a extração de um composto e para eliminar interferentes.

Na literatura, é possível encontrar artigos com referência à análise de cafeína por CCD, mas em amostras de chás, cafés e medicamentos, ou seja, em concentrações bem mais altas. Efedrina em plantas, e anfetaminas e sibutraminas em laxantes fitoterápicos também são relatados na literatura, mas em todos os casos estamos falando na determinação do composto na própria matéria-prima, ou seja, com dosagens altas.

Porém, em análise de doping, são necessárias as técnicas as mais sensíveis possíveis, como já foi mencionado.

Por isso, infelizmente, esse tipo de análise não pode ser realizado por técnicas cromatográficas clássicas, mas sim com os instrumentos mais sensíveis existentes no mercado. Essa teria que ser a resposta de Luis ao participante.

No link a seguir, podemos ter uma ideia do tipo de laboratório necessário para realizar esse tipo de análise. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=NAMBdgpNj5M>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

Até a próxima seção!

Avançando na prática

Separação de pigmentos de produtos naturais

Descrição da situação-problema

Em um laboratório de produtos naturais, o analista recebeu uma remessa de folhas de *espinafre* para a extração de β -caroteno e clorofilas. Após esse procedimento, os dois produtos purificados seriam encaminhados para uma indústria de alimentos para serem utilizados como corante.

Dentre os métodos cromatográficos estudados, qual você recomendaria para a purificação desse extrato? No caso da utilização da cromatografia de fase normal, qual dos pigmentos irá eluir primeiro?

Resolução da situação-problema

Considerando as técnicas cromatográficas estudadas até agora, a Cromatografia em Coluna é a mais adequada para a purificação de compostos, já que é possível utilizar grandes quantidades de amostra e, ao final da eluição, se tudo ocorreu conforme o esperado, é possível coletar as frações já separadas de β -caroteno e clorofilas. A CCD ou CP não são utilizadas com fins preparativos, pois volumes pequenos são utilizados, e a coleta dos compostos separados no cromatograma depende de um processo adicional.

Sendo assim, a técnica ideal seria a Cromatografia em Coluna. Já vimos que na cromatografia em fase normal a FE é polar e a FM é apolar. Assim, podemos supor que a FE seja alumina ou sílica, e a FM seja um solvente ou uma mistura de solventes com características polares, como o éter de petróleo.

Precisa-se considerar também a polaridade dos dois pigmentos. Os carotenos são formados, exclusivamente, por átomos de carbono e hidrogênio, sendo apolares. As clorofilas também são lipossolúveis, mas possuem um centro polar constituído de quatro átomos de nitrogênio coordenados com o magnésio, além de possuir grupamento éster e cetona. Assim, as clorofilas, mais polares, ficarão mais retidas na FE polar enquanto o β -caroteno será eluído rapidamente da coluna com a FM apolar.

E daí surge outra pergunta: como retirar as clorofilas da coluna? Para isso, pode-se usar a eluição por gradiente, ou seja, mudar a FM de éter de petróleo puro para uma mais polar contendo éter etílico ou metanol, por exemplo. Assim, o β -caroteno terá maior afinidade pela FM e será eluído da coluna em seguida.

Faça valer a pena

1. Alguns termos são amplamente utilizados na cromatografia para avaliar o desempenho de um método cromatográfico. Um deles é o Tempo de Retenção (T_r), que mede o tempo decorrido entre a introdução da amostra no sistema e o registro do máximo do composto de interesse. Outro termo muito importante de ser avaliado é a Resolução (R_s).

Em relação ao termo Resolução, assinale a seguir a alternativa que o define melhor.

- a) É a razão entre os tempos de retenção ajustados de dois picos adjacentes.
- b) É o tempo que o componente fica retido no sistema cromatográfico.
- c) É a medida da largura do pico em relação ao seu tempo de retenção.
- d) É a capacidade do sistema cromatográfico de separar dois picos adjacentes.
- e) É a capacidade do sistema cromatográfico de produzir picos separados, simétricos e finos.

2. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é um tipo de cromatografia _____ na qual a fase estacionária (FE) está retida em um suporte de vidro geralmente, e a fase móvel (FM), junto à amostra, percorre por ela, geralmente de forma _____, promovendo a separação dos compostos presentes na amostra. Dentre as FE mais utilizadas, podemos citar _____, e dentre as FM podemos citar _____.

Assinale a alternativa que indique o correto preenchimento das lacunas.

- a) planar – ascendente – sílica – éter de petróleo.
- b) planar – descendente – alumina – éter etílico.
- c) planar – ascendente – água – éter de petróleo.
- d) coluna – descendente – alumina – diclorometano.
- e) coluna – ascendente – sílica – éter etílico.

3. A cromatografia pode ser classificada de acordo com o mecanismo que rege a separação dos componentes de uma amostra, conforme pode ser observado no quadro a seguir:

Tipo de cromatografia	Mecanismo de separação
1. Adsorção	a. Especificidade biológica
2. Partição	b. Solubilidade
3. Troca iônica	c. Diferença de massa molecular
4. Bioafinidade	d. Polaridade
5. Exclusão	e. Força iônica

Assinale a alternativa que relaciona o mecanismo de separação (primeira coluna) com a característica correspondente (segunda coluna):

a) 1d, 2b, 3e, 4a, 5c.

b) 1b, 2d, 3e, 4a, 5c.

c) 1d, 2b, 3e, 4c, 5a.

d) 1d, 2e, 3a, 4c, 5b.

e) 1b, 2d, 3a, 4c, 5e.

Seção 2.2

Cromatografia líquida de alta eficiência

Diálogo aberto

Prezado aluno, se adentrarmos em qualquer laboratório de análise de produtos farmacêuticos, provavelmente, nos depararemos com uma grande quantidade de cromatógrafos líquidos de alta eficiência, porque a aplicação desses equipamentos na nossa área é muito grande devido à versatilidade deles.

O contexto de aprendizagem desta Unidade 2 trata de um tema bastante delicado, o doping. Vimos que os exames antidoping em atletas olímpicos são realizados nos laboratórios credenciados pela *World Antidoping Agency* (WADA), e conhecemos o farmacêutico Luis, responsável por um desses laboratórios.

A situação-problema que nos é apresentada nesta Seção 2.2 diz respeito a uma série de análises que foram hipoteticamente solicitadas ao laboratório durante os Jogos Olímpicos e Paraolímpicos no Rio de Janeiro, o Rio2016.

Naquela ocasião, o Comitê Olímpico Internacional (COI) solicitou que o laboratório coordenado por Luis realizasse a análise de betabloqueadores em amostras de urina de atletas. Luiz ficou surpreso, pois não entendeu o porquê de esses medicamentos serem proibidos em competições esportivas. Após pesquisar e conversar com alguns especialistas, ele tomou conhecimento que esses medicamentos, por diminuírem a pulsação cardíaca e a pressão arterial, eram usados nas competições de arco e flecha para manter as mãos dos atletas sem tremores durante as provas.

Luis, junto à sua equipe, precisavam definir uma metodologia urgente para a análise desses compostos e, em seguida, validar essa metodologia.

Avaliando as características físico-químicas desta classe farmacêutica, qual(is) a(s) técnica(s) mais indicada(s)? Você poderia sugerir brevemente algumas particularidades a serem observadas na análise levando em consideração a(s) técnica(s) escolhida(s)?

Não pode faltar

A grande quantidade de análises viabilizadas pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a colocam como uma das mais versáteis e mais utilizadas dentre as técnicas instrumentais. Praticamente qualquer amostra que possa ser dissolvida pode ser analisada por CLAE, e seus limites de detecção chegam a partes por bilhão ou abaixo disso.

É a mais recente das técnicas cromatográficas, pois somente a partir da década de 1970 tomou impulso. Desde então recebeu vários nomes, como cromatografia líquida de alta velocidade, de alta pressão, de alto desempenho, de alta resolução, até chegar na nomenclatura atual de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), derivada do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Atualmente, a CLAE é ainda objeto de novos avanços, possibilitando o emprego de colunas com microdiâmetros de partículas, ou ainda a utilização de grandes colunas que separam quilogramas de amostra.



Assimile

A CLAE é uma otimização da cromatografia em coluna aberta, tendo como diferencial o fato de que a FM e a amostra passam dentro de uma coluna fechada contendo uma FE especialmente preparada para suportar as altas pressões utilizadas durante a análise. O uso de altas pressões e colunas especiais permite realizar separações de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.

A CLAE é uma técnica cromatográfica que tem um líquido como FM e fases estacionárias, as quais podem ser líquidas ou sólidas, sendo as sólidas mais comumente utilizadas. As duas fases têm afinidade com os componentes da amostra. A separação dos compostos pode envolver os vários mecanismos já estudados, como adsorção, partição, troca iônica, exclusão molecular e bioafinidade.



O link disponibilizado apresenta de uma forma muito simples e didática o processo de separação em um equipamento CLAE. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=WO0OsoxaPYs8>>. Acesso em: 4 maio 2017.

Para abrigar a FE, emprega-se uma coluna fechada e reaproveitável. Essa coluna é muito eficaz, mas oferece uma grande resistência à vazão da fase móvel. Por essa razão, é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão que fazem a FM migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da FM é controlada, resultando em operações mais reprodutíveis. Uma injeção precisa da amostra é conseguida usando microsseringas ou válvulas de injeção, como veremos a seguir. Vários tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna, proporcionando um registro contínuo da composição do eluente da coluna, o que permite obter um cromatograma, o qual se utiliza para identificar e quantificar os componentes das amostras. No Quadro 2.1, podemos ver algumas das vantagens e limitações da técnica.

Quadro 2.1 | Vantagens e limitações da CLAE

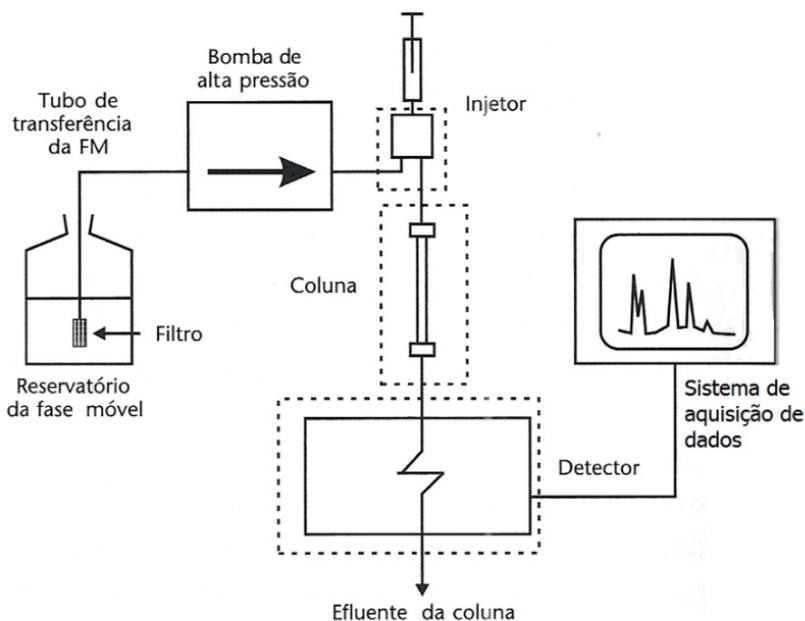
Vantagens	
Análises rápidas	Separação de compostos em poucos minutos devido à alta eficiência e à vazão rápida da FM.
Alta eficiência	Alto número de pratos por coluna: até 30.000 pratos em uma coluna padrão.
Alta resolução	Picos estreitos, separados e bem definidos, permitindo a análise de inúmeros compostos em misturas complexas, como a urina, por exemplo.
Boa análise qualitativa	Possibilidade de usar detectores para obtenção de espectros de absorvância ou de massas, além da avaliação da pureza de um pico, uso de padrões e comparação do tempo de retenção.
Excelente análise quantitativa	Permite quantificações com RSD inferiores a 0,5%.
Baixo limite de detecção	Possibilidade de medir até fentogramas (10^{-15} g) dependendo do detector utilizado.

Vantagens	
Versatilidade	Pode ser usada para compostos orgânicos e inorgânicos, amostras líquidas e sólidas, iônicas ou covalentes, de baixa ou alta massa molar. Além disso, a coluna pode ser reutilizada centenas de vezes.
Automatização	Sistemas comerciais computadorizados possibilitam a injeção automática das amostras, a separação dos compostos e a obtenção e o tratamento dos dados obtidos. Além disso, regeneram o sistema para uma próxima análise.
Baixo consumo de solventes	Vazões de FM de 0,5 a 2 mL por minuto.
Limitações	
Alto custo da instrumentação	Varia conforme a configuração, atingindo facilmente os R\$ 200.000,00.
Alto custo de operação	As fases móveis devem ter alto grau de pureza, as colunas são caras, os componentes do sistema devem ser periodicamente repostos e devem ser realizadas manutenções periódicas.
Pessoal especializado	Necessidade de treinamento especializado para o operador com o equipamento.

Fonte: adaptado de Collins, Braga e Bonato (2006) e Gil (2010).

Os componentes básicos da CLAE consistem na FM, em um reservatório das FM, no sistema de bombeamento, no sistema de injeção de amostra, na coluna cromatográfica, contendo a FE, em um sistema de detecção e em um sistema de registro e de tratamento de dados, conforme Figura 2.7.

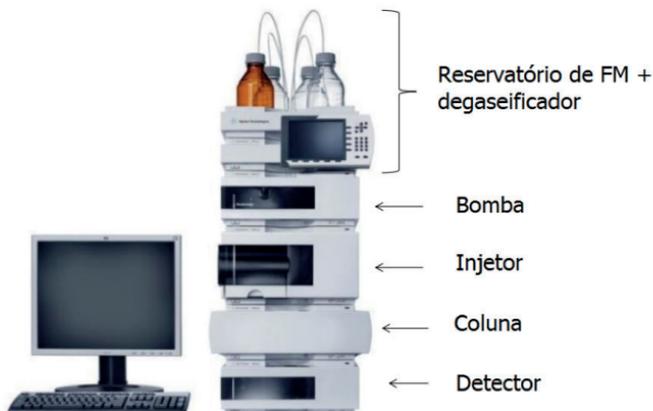
Figura 2.7 | Componentes básicos da CLAE



Fonte: Collins, Braga e Bonato (2006).

Na Figura 2.8, temos o exemplo de um dos vários tipos de CLAE comercializado atualmente.

Figura 2.8| Exemplo de um CLAE comercial



Fonte: <<http://www.labx.com/product/agilent-1200>>. Acesso em: 4 maio 2017.

Agora que já vimos as características gerais da técnica, vamos conhecer um pouco de cada um dos componentes de um sistema CLAE.

1. Fase móvel: aproximadamente, 90% dos problemas em uma análise por CLAE são decorrentes do preparo incorreto da FM. Ela deve ser sempre filtrada e degaseificada. A filtração deve ser realizada com filtros com porosidade, geralmente, entre 2 e 5 μm , antes de ser guardada no reservatório (filtração realizada pelo usuário) e também no caminho entre o reservatório e a coluna (filtros já embutidos no sistema), a fim de evitar entupimento das conexões e da coluna. Já a degaseificação é um processo utilizado para eliminar gases, tais como o oxigênio, que podem ser responsáveis pela formação de bolhas na bomba ou no detector, causando o aparecimento de sinais no cromatograma. Esse processo pode ser feito com a aplicação de ultrassom, aquecimento, vácuo ou refluxo. No caso de fases móveis aquosas preparadas no laboratório, deve-se utilizar ultrapurificadores de água e tomar muito cuidado com o uso de soluções tampão. O pH utilizado também deve ser sempre verificado, pois a maioria das colunas cromatográficas trabalha em uma faixa de pH de 2,0 a 9,0.

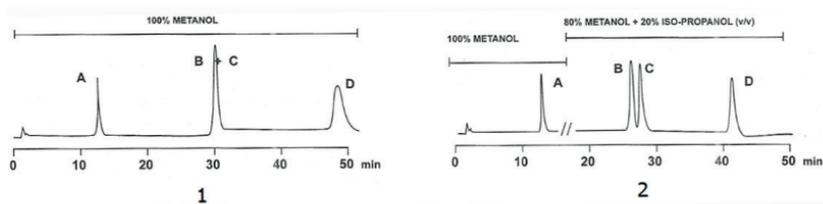
A CLAE pode operar no modo normal (FE polar) ou no modo reverso (FE apolar), como já vimos na última seção. Hoje, aproximadamente, 80% das análises por CLAE utilizam fase reversa, pois permite a análise de compostos hidrossolúveis, iônicos e até lipofílicos. A fase normal é restrita à análise de compostos insolúveis em água, como óleos e gorduras.

2. Reservatório da fase móvel: deve ser inerte, ou seja, a FM não deve extrair compostos orgânicos ou inorgânicos do recipiente, ou vice-versa. Os mais utilizados são os reservatórios de vidro. Deve-se evitar lavar os reservatórios com detergente ou outro produto, preferindo-se lavar com a própria FM, e deve-se tomar cuidado com o crescimento microbiológico, principalmente em FM aquosas.

3. Bombas de alta pressão: responsáveis por permitir o fluxo da FM a uma pressão alta e constante em um sistema que trabalha com FE compacta e composta de partículas muito reduzidas. Essas partículas exercem resistência muito alta ao fluxo da FM, que deverá deslocar-se em alta pressão, caso contrário a

análise seria extremamente lenta. O fluxo da FM também deve ser constante, a fim de garantir a reprodutibilidade, sensibilidade e resolução da análise. A eluição pode ser do tipo isocrática ou por gradiente (Figura 2.9). Na isocrática, a composição da FM não muda durante a análise (Figura 2.9, cromatograma 1, coeluição dos picos B e C). Na eluição por gradiente, a FM pode ser alterada (Figura 2.9, cromatograma 2, picos B e C resolvidos). O gradiente de concentração dos solventes é muito utilizado para separar compostos com Tr muito próximos, que não seriam separados em condições isocráticas (picos B e C da Figura 2.9), ou para diminuir o tempo de retenção de um composto separado e que elua muito depois dos outros compostos (pico D da Figura 2.9). No cromatograma 2 desta mesma figura, é possível observar que os picos B e C se tornaram seletivos (separados um do outro) e resolvidos (separados, finos e simétricos).

Figura 2.9 | Representação de uma eluição isocrática (cromatograma 1) e de uma eluição por gradiente (cromatograma 2)



Fonte: adaptada de Gil (2010).

As bombas empregadas em CLAE devem operar a pressões de até 500 atm com a mesma precisão e exatidão de operações à pressão quase ambiente; não devem ser corroídas pelas FM empregadas; as válvulas e os pistões devem ser extremamente resistentes a altas pressões, atritos etc.; seus controles eletrônicos devem permitir a programação da vazão e a possibilidade de parar o processo por razões de segurança. As mais utilizadas são as recíprocas, tipo seringa e pneumáticas.

As bombas recíprocas escoam volumes constantes de forma não contínua, isto é, pulsante. Operam mediante o movimento de um pistão ou diafragma e através de um sistema de válvulas que, alternadamente, se abrem e fecham. Uma das desvantagens desse tipo de bomba é que se obtém uma vazão pulsando, e não em forma

contínua e uniforme. Isso pode causar perda na eficiência da coluna e instabilidade do detector. Mesmo assim, são as mais utilizadas.

As bombas tipo seringa, chamadas também de êmbolo ou deslocamento contínuo, possuem um êmbolo ou pistão que é deslocado de forma contínua e uniforme por um motor, comprimindo o líquido contido em uma câmara. O líquido flui através de uma abertura na câmara e se obtém assim uma vazão livre de pulsações. A desvantagem é que o volume da câmara é limitado e não é possível realizar a eluição por gradiente.

No caso das bombas pneumáticas, o líquido é deslocado mediante a pressão exercida por um gás inerte à alta pressão. Pode ser feito de forma direta sobre o líquido ou sobre o recipiente comprimível que o contém. As desvantagens dessas bombas são a capacidade limitada no volume, que pode ser bombeado, e a difusão, que apresenta o gás no líquido quando está em contato direto.

4. Sistema de introdução (ou injeção) da amostra: a quantidade de amostra que deve ser injetada na coluna depende da sensibilidade do detector, que deve responder com exatidão e precisão aos analitos separados na coluna. Os injetores de amostra devem ser reprodutíveis e ter grande variedade de volumes de injeção. Os tipos de injetores disponíveis em CLAE são os manuais (microseringas), de válvula rotatória e os automáticos.

O injetor manual tipo microseringa é o mais simples e barato, porém apresenta baixa reprodutibilidade devido à dificuldade de injetar volumes precisos (é sensível ao erro humano). Já nos injetores de válvula rotatória, a amostra é injetada na válvula através de uma microseringa. O volume injetado não necessita ser preciso, pois a válvula rotatória contém uma alça capilar amostradora, a qual pode selecionar o volume (as mais comuns são as de 20, 50 ou 100 μL), drenando o excesso para fora do equipamento. Após a injeção da amostra com a microseringa, a válvula é girada de maneira que a fase móvel arraste a amostra para dentro da coluna à alta pressão. As maiores desvantagens são os volumes limitados de alça disponíveis e a necessidade de trocá-la quando se deseja injetar volumes diferentes de amostra.

Os injetores automáticos trabalham de forma similar às válvulas rotatórias, no entanto são operados pelo computador. O volume injetado pode ser escolhido dentro de um intervalo. Dentre as

vantagens, a principal é a possibilidade de programar injeções sequenciais, independente da presença do analista. Também, possibilita operações, como diluições ou derivações. O maior problema é o alto custo de aquisição e manutenção.

5. Colunas cromatográficas: as maiores contribuições para o alargamento de banda em CLAE são as descritas na Equação de Van Deemter, e todas são relacionadas às características das colunas, por exemplo, o comprimento da coluna, o tamanho médio das partículas (FE), a distribuição das partículas, a configuração da coluna e o empacotamento. As colunas utilizadas em CLAE devem ser de material inerte, ter diâmetro interno uniforme e resistir ao ataque e à pressão da fase móvel. Três tipos de colunas são utilizados na CLAE, como vemos na Figura 2.10.

Figura 2.10 | Tipos de colunas usadas em CLAE

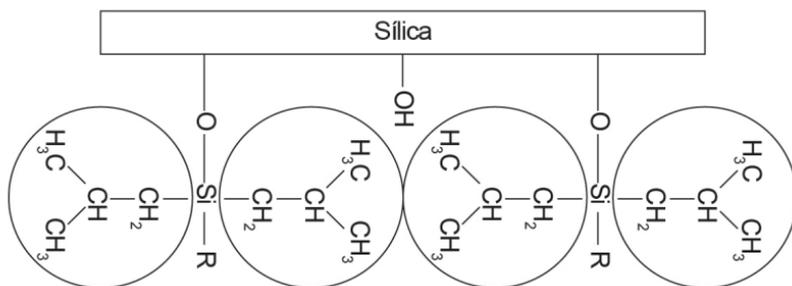


Fonte: elaborada pela autora.

A coluna de saturação, também chamada de pré-coluna, é uma coluna colocada entre a bomba e o injetor e tem como principal finalidade reter as impurezas da FM. Já a coluna de guarda é colocada entre o injetor e a coluna analítica e, geralmente, possui o mesmo diâmetro e FE da coluna analítica. Sua finalidade principal é reter as impurezas da amostra para preservar a coluna analítica. Por fim, temos a coluna analítica, que é a responsável pela separação dos componentes da amostra. O tubo da coluna analítica pode ser de vários materiais e vários tamanhos, sendo os mais utilizados os de aço inoxidável e sílica fundida. As dimensões variam de 30 a 300 mm de comprimento e 0,1 a 15 mm de diâmetro interno. Esse tubo é recheado com partículas de FE com diâmetro que varia de 1,0 (colunas mais modernas, tipo *ultra-high performance liquid chromatography* – UHPLC) a 10 μm (colunas convencionais). Como o tempo de retenção e outras propriedades do cromatograma dependem da temperatura, em muitos casos, a coluna é mantida dentro de um termostato.

Quanto às FE utilizadas na CLAE, elas variam em termos de rigidez (rígida, como a sílica, ou semirrígida, como a DVB), estrutura (porosa ou não porosa) e forma (regulares e irregulares). As FE podem ser baseadas no mecanismo de adsorção (FE é uma partícula porosa), de partição (FE é um líquido fracamente sorvido), dentre os outros já estudados. No caso da partição, quando o líquido é substituído por um líquido polimérico, como polisiloxanos, as fases passam a ser conhecidas como “quimicamente ligadas”, pois são obtidas pela reação covalente entre os grupos silanóis da sílica (Si-OH) e os compostos contendo grupos polares (CLAE de fase normal) ou apolares (CLAE de fase reversa). As vantagens dessa FE incluem a maior estabilidade química, devido à ligação covalente, e a possibilidade do uso de altas temperaturas e vazões. Infelizmente, devido ao impedimento estérico, geralmente, menos de 50% dos grupamentos silanóis conseguem reagir, conforme pode ser observado na Figura 2.11. As FE mais empregadas são as de fase reversa, especialmente as com grupamentos octadecil (C_{18}), octil (C_8) e fenil.

Figura 2.11 | Representação de uma fase estacionária quimicamente ligada



Fonte: adaptada de Collins, Braga e Bonato (2006).



Refleta

As colunas contendo FE quimicamente ligada apresentam inúmeras vantagens, sendo que, hoje, representam grande parte das FE utilizadas na CLAE. No entanto, muitos grupos silanóis permanecem livres devido ao impedimento estérico. Quais são as consequências desses grupamentos polares livres em uma análise cromatográfica?

6. Sistemas de detecção: é a parte do equipamento que mede de forma contínua alguma propriedade física dos componentes da amostra separados na coluna analítica, enviando como resposta um sinal elétrico que será registrado no processador como um pico. Existem vários tipos de detectores que podem ser utilizados, dependendo do tipo de composto que será analisado. Porém, todos devem atender a alguns requisitos, como alta sensibilidade, eficiente detecção mínima, baixo nível de ruído, grande intervalo de linearidade, alta estabilidade e boa repetibilidade.

Dentre os detectores, o detector de absorção UV/visível é o mais utilizado em CLAE, pois é sensível e capaz de detectar um grande número de compostos. O detector de arranjos de diodos tem as mesmas características do detector UV/visível, com a vantagem adicional de oferecer o espectro do componente que está sendo separado na coluna cromatográfica, permitindo assim tornar a identificação do composto mais conclusiva. O detector por índice de refração é o mais universal, isto é, capaz de detectar todo tipo de composto, porém sua sensibilidade e reprodutibilidade são muito baixas. O detector de fluorescência é limitado a compostos que têm a capacidade de fluorescer quando recebem radiação UV, ou que são modificados quimicamente (derivatizados) para tal. Possuem alta sensibilidade e especificidade. Os espectrômetros de massas, apesar do alto custo e da necessidade de especialistas para operá-los, têm se tornado cada vez mais comuns devido à sua particularidade de fornecer informações sobre a massa molar e sobre a estrutura de um composto, permitindo a identificação e a confirmação da presença de um composto em uma amostra. Na unidade 4, voltaremos a falar sobre a espectrometria de massas.

7. Tratamento dos dados: após a obtenção do cromatograma, faz-se a integração dos sinais, que tem por finalidade transformar a intensidade do sinal emitido pelo detector em uma medida relacionada à quantidade da substância analisada na amostra. A integração dos sinais, geralmente, é feita usando-se a área do pico, a qual pode ser relacionada à concentração de uma dada substância na amostra através de métodos, como a calibração interna, a padronização externa ou pelo método de adição-padrão, como detalhamos na unidade 1. Independentemente do método de quantificação utilizado, a solução de padrões e a matriz da amostra devem ser as mais similares possíveis. As concentrações das soluções

de padrões devem ser similares às dos compostos desconhecidos e na faixa de linearidade do detector. As condições de análise devem ser idênticas para curva padrão e amostra. No caso das análises qualitativas, na maior parte das vezes, utiliza-se como parâmetro o tempo de retenção do padrão e da amostra aliado a detectores que permitem a obtenção de informações estruturais das moléculas eluídas (como os que fornecem os espectros).



Exemplificando

Entre as aplicações da CLAE, podemos citar a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como uma imensa variedade de outros compostos, como: aminoácidos, explosivos, lipídeos polares, metabólitos de plantas e animais, pigmentos de plantas, polímeros sintéticos, polissacarídeos, produtos farmacêuticos, pesticidas, proteínas, tintas, entre outros.



Pesquise mais

Nesta seção, citamos brevemente a cromatografia líquida de ultraeficiência (*ultra-high performance liquid chromatography – UHPLC*). Trata-se de uma evolução da CLAE cada vez mais presente nos laboratórios de análises.

Para saber mais, acesse o link. Disponível em: <<http://www.scienciacromatographica.com/files/v4n3/v4n3a14.pdf>>. Acesso em: 4 maio 2017.

Sem medo de errar

Caro aluno, no *Diálogo aberto* desta seção, retomamos o problema envolvendo doping nos esportes. O laboratório coordenado por Luis recebeu uma solicitação do Comitê Olímpico Internacional (COI) para realizar a determinação de betabloqueadores em amostras de urina. Assim, nos foi proposto refletir e indicar as possíveis técnicas a serem utilizadas para essa análise.

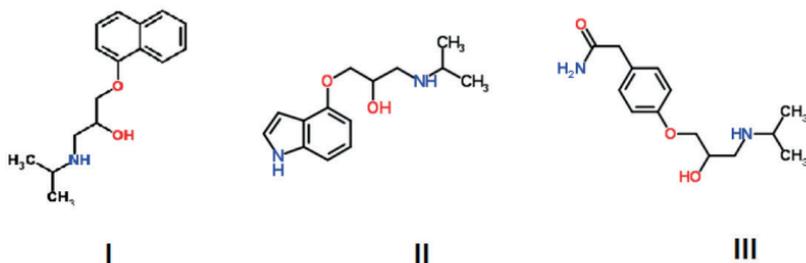
Primeiramente, ele verificou quais modalidades esportivas apresentavam restrições ao uso dessa classe de fármacos. Descobriu que, além do arco e flecha, o uso desses compostos

era proibido no automobilismo, lançamento de dardo, golfe, tiro e outros esportes olímpicos ou não. Sua proibição se deve ao fato de que eles têm como indicações para usos terapêuticos: combatem a ansiedade e são relaxantes musculares, diminuindo o ritmo cardíaco e tremores, sendo assim muito utilizados em esportes que requerem alta precisão. Atenolol, carvedilol, esmolol, metoprolol, nadolol, pindolol, propranolol e timolol são alguns dos fármacos da classe citados na lista de substâncias proibidas, encontrados em vários medicamentos comerciais.

Com base nessas informações, ele concluiu que o número de amostras não deveria ser tão grande, comparada ao número de amostras recebidas provenientes de outras modalidades, já que se tratava de uma modalidade individual, e que a restrição era somente para praticantes desses esportes. Por outro lado, a lista de fármacos da classe era grande, ou seja, ele precisaria, de preferência, de um método capaz de determinar todos os compostos. Se isso fosse possível!

Avaliando as estruturas químicas dos compostos (Figura 2.12), ele percebeu que todas tinham um ou mais anéis aromáticos e uma cadeia contendo grupamentos polares e apolares.

Figura 2.12 | Estrutura química dos fármacos propranolol (I), pindolol (II) e atenolol (III), alguns dos representantes dos β -bloqueadores



Fonte: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 18 maio 2017.

Como a análise seria realizada na urina, outra coisa que ele levou em consideração foi que essa amostra é bastante complexa (ele leu recentemente que mais de 3.000 compostos químicos estão presentes na urina) e composta por várias substâncias químicas com características naturalmente hidrofílicas ou que se convertem para tais devido à reações de formação de sais solúveis.

Assim, ele decidiu focar em um bom preparo de amostra que eliminasse a maioria dos interferentes presentes e concentrasse os compostos de interesse. Conversou com a sua equipe para testar a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a extração líquido-líquido (LLE) com suas derivações.

Outra parte da equipe focou na otimização da análise cromatográfica. Devido às características das moléculas e aos baixíssimos limites de detecção, duas linhas de pesquisa poderiam ser utilizadas: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG). Ainda, o detector escolhido por unanimidade foi o espectrômetro de massas (EM), já que permite obter informações estruturais das moléculas. Pensando na CLAE, outra decisão unânime foi o uso do UHPLC, já que serão, aproximadamente, 20 compostos a serem resolvidos, ou seja, uma técnica rápida é a melhor opção. Por isso, decidiram usar colunas cromatográficas pequenas com tamanho de partícula reduzido, contendo assim um grande número de pratos. Optaram também pelo uso da fase reversa, utilizando como fase móvel solventes com polaridades diversas, preferencial e majoritariamente água. Outra decisão tomada após conseguirem a separação completa dos compostos foi testar alguns gradientes para permitir a redução no tempo de análise, a limpeza do sistema e o acondicionamento para a próxima amostra.

Após duas semanas de testes nesta metodologia, o laboratório definiu as condições experimentais: uso de um sistema UHPLC-MS/MS com uma coluna C_{18} de 50 mm de comprimento x 2,1 de diâmetro interno, com tamanho de partícula de 1,8 μm (50 x 2,1 mm, 1,8 μm) mantida a 45°C. A fase móvel escolhida foi água:acetonitrila:trietilamina (83:17:0,2, v/v/v) na condição inicial, variando essa condição no decorrer do gradiente. A vazão da fase móvel foi de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A separação completa de todos os compostos ocorreu em 10 minutos de análise.

Resumindo, ele conseguiu um método de análise rápida e que contemplasse todos os fármacos desta classe de medicamentos.

Mas o trabalho não havia terminado. Lembre-se de que após o desenvolvimento é necessária a validação desse método, porém acreditamos que vai dar tudo certo.

Até a próxima seção!

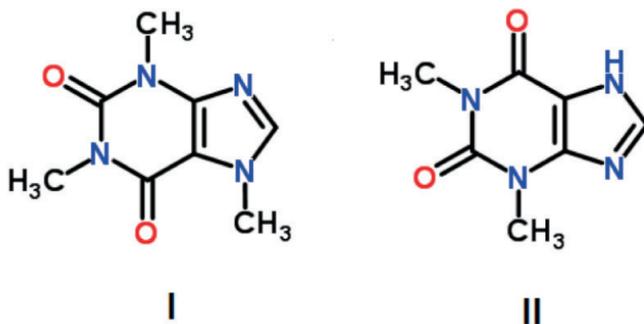
Metilxantinas em amostras de chás comerciais

Descrição da situação-problema

A cafeína é um alcaloide natural encontrado em mais de 60 espécies de plantas do mundo. Junto à teofilina e à teobromina, compõe o grupo químico conhecido como metilxantinas. Esses compostos são consumidos em todo o mundo através do café, chá, produtos de chocolate, refrigerantes, mate, sementes de guaraná e medicamentos, como emagrecedores, diuréticos, estimulantes e analgésicos.

A estrutura de dois dos compostos pode ser observada na figura a seguir.

Figura 2.13 | Estrutura química da cafeína (I) e da teofilina (II)



Fonte: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 18 maio 2017.

Em uma análise cromatográfica hipotética de chá preto utilizando cromatografia de fase reversa, com **MeOH** : **H₂O** (30:70, v/v) como fase móvel e uma coluna **C₁₈** (150 x 4,6 mm, 5 μm de tamanho de partícula) como fase estacionária, dois picos foram observados: o primeiro com Tr de 4,51 min, e o segundo com Tr de 6,32 min. Após a análise finalizada, o analista percebeu que esqueceu de injetar os padrões separados das duas substâncias para saber qual delas era a cafeína e qual a teobromina.

Baseado nos conhecimentos adquiridos até agora, qual a provável ordem de eluição desses dois compostos?

Resolução da situação-problema

Avaliando as estruturas químicas dos dois compostos, podemos observar suas características polares advindas dos grupamentos $C=O$ e $C\equiv N$ e apolares advindas do grupamento CH_3 . Um importante detalhe a ser observado é que a cafeína tem três grupamentos CH_3 , o que a torna mais apolar do que a teofilina. Considerando que o enunciado nos diz que foi utilizada fase reversa C_{18} , a FE é apolar, logo, compostos mais apolares tendem a ficar mais tempo retidos nesta FE. Já a teofilina, mais polar, provavelmente, migre mais rapidamente com a FM polar.

Assim, a provável ordem de eluição dos dois compostos é a teofilina eluindo em 4,51 min, e a cafeína eluindo da coluna em 6,32 min.

Faça valer a pena

1. O surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) elevou a exatidão e a precisão das análises cromatográficas a um nível muito superior do que se via na cromatografia clássica.

Ainda em relação à CLAE, julgue os itens a seguir:

I. A CLAE é uma técnica automatizada, uma vez que permite, por exemplo, a injeção automática de uma sequência de amostras e padrões.

II. A automação é conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico.

III. A automação permite regenerar suas condições iniciais de uma análise para, em seguida, injetar uma nova amostra.

IV. A automação garante uma resposta adequada mesmo quando a amostra é injetada fora da faixa linear do detector.

Identificando as afirmações como verdadeiras (V) ou falsas (F), assinale a sequência correta.

- a) V – V – V – V.
- b) V – V – V – F.
- c) V – F – V – F.
- d) F – V – F – V.
- e) F – F – F – V.

2. Em um cromatógrafo líquido, até três tipos de colunas podem ser utilizados. A coluna _____ é responsável pela separação dos componentes da amostra, a coluna _____ é a responsável por reter as impurezas da amostra e a coluna _____ é a responsável por reter as impurezas da fase móvel.

Assinale a alternativa que indica o correto preenchimento das lacunas.

- a) analítica – de guarda – de saturação.
- b) analítica – de saturação – de guarda.
- c) de guarda – analítica – de saturação.
- d) de guarda – de saturação – analítica.
- e) de saturação – analítica – de guarda.

3. O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico. Ele mede de forma contínua alguma propriedade da amostra e envia um sinal para registro diretamente proporcional à concentração do componente que se deseja medir.

A seguir estão relacionados três detectores muito utilizados na cromatografia líquida e uma característica de cada um deles. Associe o tipo de detector (coluna da esquerda) com sua característica (coluna da direita).

Detector	Característica
1. Detector de UV-Vis	a. Alta sensibilidade e especificidade, pois são limitados a compostos que fluorescem naturalmente ou após modificação química.
2. Detector de fluorescência	b. É capaz de fornecer informações sobre a massa molar e sobre a estrutura de um composto.
3. Detector de massas	c. É sensível e capaz de detectar grande número de compostos.

A seguir, assinale a alternativa que contém a sequência correta da associação.

- a) 1a, 2c, 3b.
- b) 1a, 2b, 3c.
- c) 1b, 2c, 3a.
- d) 1c, 2a, 3b.
- e) 1c, 2b, 3a.

Seção 2.3

Cromatografia Gasosa

Diálogo aberto

Prezado aluno, estamos acompanhando, no decorrer desta Unidade 2, a temática envolvendo doping nos esportes. Muito já foi debatido sobre esse assunto, já falamos sobre várias das classes de substâncias proibidas (entre elas, os estimulantes, analgésicos narcóticos, corticoesteroides, β -bloqueadores, β -agonistas e os esteroides anabolizantes) e os principais métodos de detecção.

No entanto, nesta última situação-problema, vamos falar um pouco sobre duas classes de substâncias também proibidas em várias modalidades, mas que, muitas vezes, de tão habituados que estamos com elas na nossa sociedade, acabamos esquecendo que também são drogas de abuso e que trazem sérias complicações aos usuários.

Vamos falar do álcool e dos canabinoides.

Segundo o Código Mundial Antidopagem, o álcool etílico (etanol) é proibido em esportes aéreos, arco e flecha, motociclismo, automobilismo e lancha de potência. A detecção é realizada por análise do sangue ou por análise respiratória (ar exalado). O limite para a violação de dopagem é equivalente a uma concentração de álcool no sangue de **0,10 g.L⁻¹**.

Já no caso dos canabinoides, tanto os naturais (*Cannabis*, haxixe e maconha) como os sintéticos (delta 9-tetrahydrocannabinol sintético, THC), são proibidos em todas as modalidades, o mesmo se aplicando aos canabimiméticos, ou seja, substâncias com estrutura química análoga aos canabinoides.

Luis, o farmacêutico responsável por um laboratório credenciado pela WADA, recebeu uma grande demanda de análises desses compostos. No entanto, em seu laboratório, ele dispunha somente de cromatógrafos líquidos acoplados aos mais diferentes tipos de detectores.

Segundo seus conhecimentos, ele conseguirá atender a essa nova demanda? Quais as características desse tipo de moléculas e que tipo de equipamento é o mais adequado para esses casos?

Preparado para seguir em frente? Então, vamos nessa!

Não pode faltar

Em 1941, Martin e Synge publicaram um artigo sobre separação de aminoácidos utilizando a cromatografia por partição, e dentre as conclusões do estudo eles citaram:



A fase móvel não necessariamente precisa ser um líquido, mas pode ser um vapor [...] Separações muito refinadas de substâncias voláteis podem ser conseguidas em uma coluna onde um gás permanente é forçado a fluir através de gel impregnado com um solvente não volátil [...]. (p. 1359)

Anos mais tarde, em 1952, James e Martin introduziram a cromatografia gás-líquido, a qual, até hoje, é conhecida como cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia a gás, e é considerada uma das técnicas mais úteis para análises de gases e compostos orgânicos voláteis ou derivados com igual característica.

Como todos os processos cromatográficos que vimos até agora, a técnica de cromatografia gasosa é utilizada para separar os componentes de uma amostra através da sua distribuição entre as FM e FE. No entanto, o grande diferencial em relação à CLAE é que, neste caso, a FM é um gás inerte e a amostra deve estar na forma de vapor, para então ser carregada pelo gás.



Assimile

Na cromatografia a gás, os componentes de uma amostra no estado de vapor são separados em consequência de sua partição entre uma FM gasosa e uma FE líquida ou sólida contida em uma coluna analítica.

Como a FM é um gás inerte, ela não interage com os componentes da amostra, e a separação se dá unicamente pela interação da amostra com a FE. A função da FM é unicamente transportar o analito através da coluna.

Por meio de um sistema de injeção adequado, a amostra é introduzida na coluna cromatográfica contendo a FE. O uso de altas temperaturas no local da injeção da amostra possibilita a vaporização das substâncias presentes na amostra. Conforme as propriedades das substâncias e da FE empregada, os compostos são seletivamente retidos e chegam à saída da coluna em tempos diferentes, sendo detectados pelo sistema de detecção localizado na saída da coluna.

A CG é uma técnica com alto poder de resolução, tornando possível a análise de dezenas de substâncias em pouco tempo de análise. Além disso, tem baixos limites de detecção (10^{-15} g dependendo do detector), utiliza volumes pequenos de amostra e é excelente como técnica quantitativa. Comparativamente à técnica CLAE, pode-se dizer que uma complementa a outra em função das diferentes aplicações. No Quadro 2.2, é realizada uma comparação entre as características das duas técnicas.

Quadro 2.2 | Comparação entre CG e CLAE

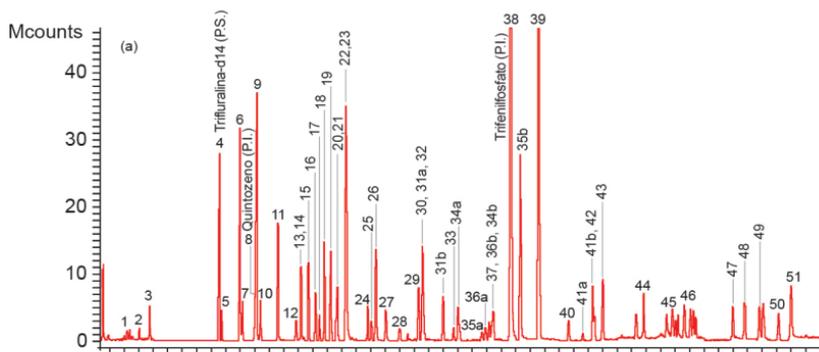
Fator	CG	CLAE
Requisito da amostra	Volátil e termicamente estável	Solúvel na FM
Tipo de amostra	Gases, líquidos e sólidos	Líquidos e sólidos
Quantidade mínima detectável	10^{-12} (detector ECD)	10^{-9} (detector UV)
Tempo de análise	Minutos até poucas horas	Minutos até muitas horas
Pratos teóricos/coluna	Até 300.000	Até 30.000
Capacidade analítica	Até 200 componentes	Até 50 componentes
Tempo de treinamento do operador	3 meses	6 meses

Fonte: adaptado de Murta et al. (1981).

As análises mais rápidas ocorrem em função do alto fluxo de gás dentro da coluna e das altas temperaturas no processo de transferência de massa, que é mais rápido na fase gás. Outras vantagens da CG incluem um menor volume injetado, uma vez que as colunas capilares suportam volume muito pequeno, geralmente,

1 µL ou menos; menor (ou nulo) consumo de solvente, já que utiliza gases como fase móvel; e uma maior resolução e eficiência na separação, pois ocorre menor alargamento de banda, visto que os compostos se dispersam menos durante a passagem pela coluna capilar (transferência de massa mais rápida), proporcionando picos mais estreitos, separados e simétricos. Na Figura 2.14, é possível ver a grande capacidade de separação devido à alta eficiência de separação. Em CG, são comuns picos com 300.000 pratos teóricos.

Figura 2.14 | Cromatograma de separação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino

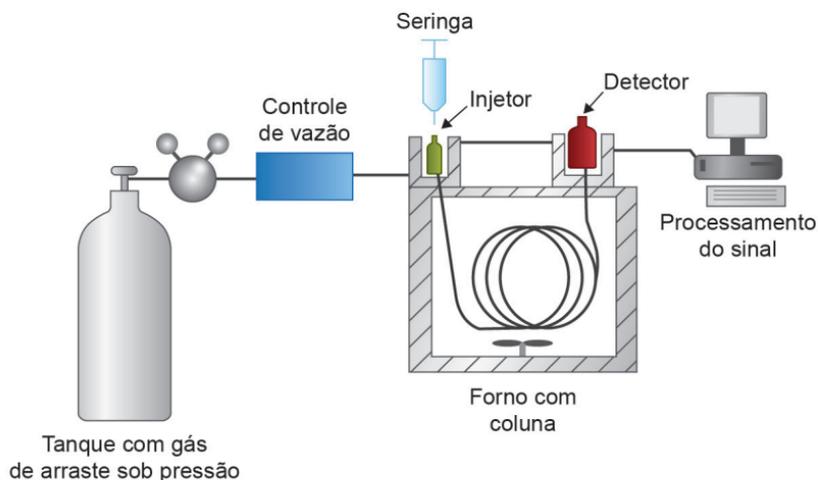


Fonte: adaptada de Bandeira et al. (2014).

Seguramente, a principal desvantagem da técnica é a limitação para compostos voláteis (ou gases) e termicamente estáveis. Caso contrário, há a necessidade de se formar um derivado com essas características, o que, dependendo do composto, não é possível, além de adicionar uma etapa a mais no processo de preparo da amostra para a análise. Além disso, a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra. Também, não é uma boa técnica preparativa.

Um sistema cromatográfico básico é constituído de um cilindro com gás de arraste, controladores de pressão e vazão, um injetor, um forno de colunas, um detector e um registrador, conforme pode ser observado na Figura 2.15. Na Figura 2.16, podemos ver um modelo de cromatógrafo a gás comercialmente disponível no mercado.

Figura 2.15 | Esquema de um cromatógrafo gasoso



Fonte: Soares (2006).

Figura 2.16 | Modelo de um cromatógrafo a gás comercial



Fonte: OEI (2017).

Agora, vamos ver com detalhes cada componente do instrumento.

1. Gás de arraste: a FM, sendo gasosa, permite um equilíbrio rápido entre ela e a FE. Um cilindro contendo gás sob alta pressão serve como fonte do gás de arraste, que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, quando elas não

estiverem interagindo com a FE. Para conduzir a amostra através da coluna até o detector, é necessário que o gás de arraste seja inerte, compatível com o detector, tenha mínima difusão gasosa, seja disponível, barato e seguro e tenha alta pureza. Hidrogênio, nitrogênio, argônio e hélio (com alta pureza) são os gases mais empregados como FM em cromatografia a gás. Esse componente não está representado na Figura 2.16, pois, na prática, ele e os controladores de vazão ficam armazenados na parte externa do laboratório por questões de segurança.

2. Controladores de vazão e de pressão: a vazão do gás de arraste é um parâmetro importante que depende do diâmetro e do comprimento da coluna cromatográfica. Ela deve ser constante durante a análise, independentemente de variáveis operacionais, tais como pressão na entrada da coluna, pressão na saída do detector, temperatura, etc., para que haja reprodutibilidade nos tempos de retenção.

3. Sistema de injeção da amostra: o injetor tem a função de vaporizar a amostra, geralmente líquida. Essa vaporização deve ser rápida e completa, sem decompor e fracionar a amostra. A injeção da amostra deve ser feita de tal forma que se obtenha uma banda única e estreita, sendo que falhas na técnica de injeção podem causar assimetria nos picos. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, determinada pela quantidade de fase estacionária.

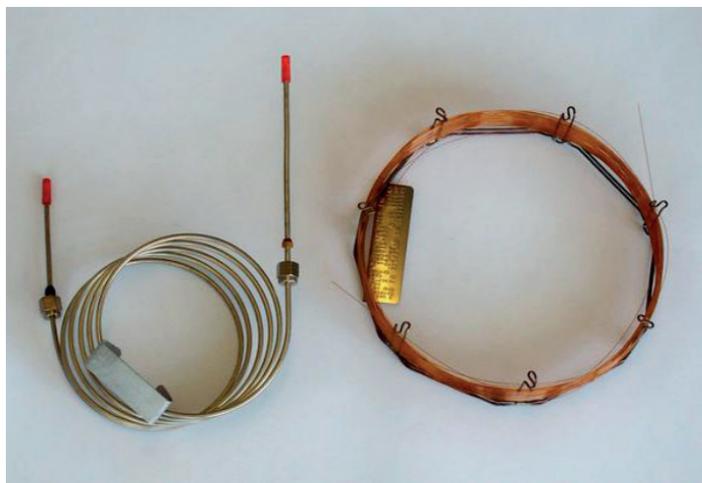
Os injetores podem ser de vários tipos: a injeção por seringa é a mais comum de ser utilizada em colunas empacotadas. Os volumes de injeção variam entre 0,1 e 2,0 μl , dependendo do tipo de coluna e injetor. Já o injetor *split* é muito utilizado em colunas capilares e de sílica fundida, principalmente para amostras concentradas. É um sistema que faz a vaporização da amostra enquanto ela é misturada com o gás de arraste, permitindo que uma pequena fração de amostra volatilizada entre na coluna ao mesmo tempo que a maior parte é jogada para fora do equipamento. Os injetores no modo *splitless* são muito utilizados para a análise de compostos presentes em baixas concentrações em uma amostra, pois grandes quantidades de amostra são injetadas. Muitos injetores comerciais são construídos para trabalharem nos dois modos, *split* e *splitless*. O injetor *on column* difere dos já citados, porque a amostra é

injetada com seringa diretamente na coluna, sem pré-aquecimento e sem mistura com o gás de arraste na câmara, existentes nos outros tipos de injetores.

4. Forno com a coluna cromatográfica: na CG, a temperatura é um fator extremamente importante para a separação. Análogo ao gradiente de solvente utilizado na CLAE, aqui, geralmente, se utiliza gradiente de temperatura para melhorar a separação e diminuir o tempo de análise (cromatografia gasosa com temperatura programada). A outra opção, pouco utilizada, é a cromatografia gasosa isotérmica, ou seja, sem variar a temperatura.

Existem dois tipos principais de colunas cromatográficas: as empacotadas e as capilares (Figura 2.17). As colunas empacotadas são constituídas, preferencialmente, com aço inox ou vidro. O formato da coluna varia de acordo com o aparelho, sendo, geralmente, espirais, ocupando um menor espaço. Apesar do seu uso ainda presente em alguns laboratórios, foram praticamente substituídas pelas colunas capilares atualmente. As colunas capilares são capilares muito finos, com diâmetros internos de 0,15, 0,32, 0,53 e 0,75 mm, e comprimentos de 10 a 100 m. O material de construção dessas colunas pode ser níquel, aço inox, vidro ou, preferivelmente, sílica fundida, por ser altamente inerte, pura e produzir colunas flexíveis. As fases estacionárias mais utilizadas são as apolares (como as com 100% de dimetilpolisiloxano), as com níveis baixos ou médios de polaridade (em que parte do dimetilpolisiloxano é substituído por outros compostos, como 20% difenil ou 6% de cianopropil) e ainda com alta polaridade (à base de polietilenoglicol). Nas colunas capilares, há um aumento significativo no número de pratos teóricos, pois a pressão é muito menor do que em colunas recheadas e, conseqüentemente, o comprimento da coluna pode ser muito maior. Outras vantagens no uso de colunas capilares são a eliminação do alargamento de bandas devido à irregularidade no enchimento, bem como análises mais rápidas, mesmo em temperaturas baixas.

Figura 2.17 | Coluna empacotada de aço inox (I) e coluna capilar de sílica fundida (II)



Fonte: <<https://goo.gl/zPP9TM>>. Acesso em: 17 maio 2017.

5. Sistema de detecção: os detectores de cromatografia gasosa são dispositivos que transformam em um sinal elétrico conveniente a variação da composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica. Do mesmo jeito que os injetores, os detectores devem ser operados com temperatura de 50°C acima da temperatura final da coluna para evitar condensação da amostra, água ou outras substâncias formadas. Algumas propriedades importantes dos detectores são a seletividade, sensibilidade, nível de ruído, quantidade mínima detectável e faixa linear. Na prática, nem todas essas características podem ser atendidas, então se escolhe o detector que melhor se adapta ao tipo de análise a ser realizada. Os principais são o detector de condutividade térmica (DCT), o detector de ionização de chama (DIC), o detector de captura de elétrons (DCE) e o detector de massas (EM).

O DCT baseia-se nas propriedades de os corpos quentes perderem calor com uma velocidade que depende da condutividade térmica dos gases envolventes e de sua composição. São detectores de resposta universal, sensíveis à concentração. O DIC é bastante popular devido à alta sensibilidade e à resposta quase universal, apesar de responder a propriedades do soluto. O eluente da coluna passa por uma pequena chama alimentada por hidrogênio e ar,

quando apenas o gás de arraste passa pela chama, estabelece-se pequena corrente entre os eletrodos. Porém, ao passarem as moléculas da amostra, a corrente é amplificada e registrada. Ele é sensível a compostos orgânicos, e insensível à água e a gases inorgânicos. Fornece resposta proporcional à massa da substância por unidade de tempo.

O DCE é um detector de ionização, cuja fonte de ionização é um emissor de elétrons. Os elétrons produzidos são coletados no anodo, gerando corrente, a qual é amplificada por um eletrômetro, resultando a linha de base. Se os compostos possuírem afinidade por elétrons, ao passarem pelo detector, podem "capturar" alguns, causando diminuição na corrente produzida e gerando um sinal proporcional à sua concentração. É um detector seletivo, respondendo muito bem a halogenados orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos.

Outro detector muito utilizado é o Espectrômetro de Massas (EM). Os compostos eluidos da coluna cromatográfica são bombeados para dentro de uma fonte ionizante, onde são fragmentados. Esses íons são separados em um analisador, de acordo com sua razão massa/carga, e os íons selecionados direcionados para o sistema de detecção. Uma grande vantagem desse tipo de detector (que pode ser acoplado ao CLAE também, como já vimos) é que, além da análise quantitativa, ele permite uma identificação positiva de quase todos os compostos analisados.



Pesquise mais

O processo de separação na CG tem algumas diferenças em relação à CLAE, como o fato da FM ser um gás inerte e a amostra ser volátil e estável.

Veja o funcionamento do equipamento no próximo link. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=9nYpjtRx0Zs>>. Acesso em: 12 maio 2017.

6. Tratamento dos dados: a identificação pode ser feita comparando o tempo de retenção dos padrões com os picos da amostra. Isso não é conclusivo, porque dois compostos podem ter o mesmo tempo de retenção em determinadas condições de análise, como já conversamos. O acoplamento com um

espectrofotômetro de massas (CG/EM) é a única técnica que permite uma identificação conclusiva de quase todos os compostos (exceto isômeros), em nível de microgramas.

A quantificação dos componentes de uma amostra separada por cromatografia gasosa pode ser obtida através do próprio cromatograma utilizando a altura do pico, ou mais comumente, a área do pico. Os microcomputadores acoplados ao cromatógrafo executam automaticamente, quando programados, os cálculos quantitativos de altura e área dos picos. A partir desses valores, os integradores podem calcular a concentração de cada pico de várias formas. Além da quantificação utilizando calibração externa, padronização interna e adição-padrão já estudadas, a técnica de normalização interna é, muitas vezes, utilizada na CG. Ela requer que todas as substâncias presentes na amostra sejam eluídas, e que a resposta do detector seja idêntica para todas. Consiste em comparar a área obtida no cromatograma com a porcentagem de composição da mistura. A resposta é dada em porcentagem e é uma técnica muito utilizada para quantificação de ácidos graxos.



Exemplificando

Os cromatógrafos gasosos estão de tal maneira difundidos que existe um equipamento funcionando remotamente na superfície de Marte para estudos de composição do solo e atmosférica, acoplado como instrumento de bordo do jipe *Curiosity*, da Nasa, que aterrissou no planeta em 2012.

Saiba mais no link. Disponível em: <http://allchemistry.iq.usp.br/oqsp/OQSP-2014-2-Angelo_Artonde.pdf>. Acesso em: 13 maio 2017.

Outras duas técnicas importantes de serem abordadas nesta unidade são a Cromatografia de Fluido Supercrítico (CFS) e a Eletroforese Capilar (EC).

Na CFS, também conhecida simplesmente por Cromatografia Supercrítica, a FM é um fluido no seu estado supercrítico. Esse estado é atingido a um valor de temperatura e pressão acima do ponto crítico, e nessas condições o fluido apresenta densidade e viscosidade entre a fase gás (é compressível, se comportando como

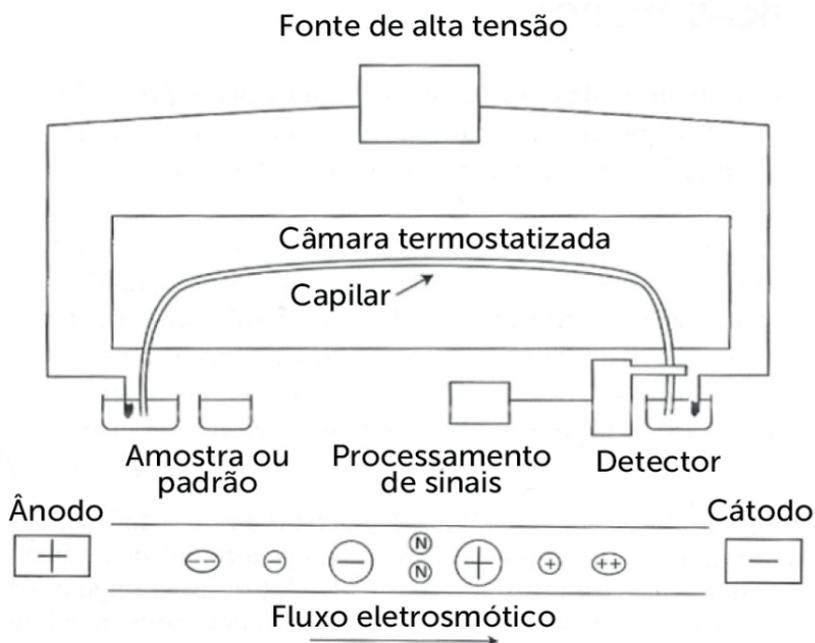
um gás) e a fase líquida (com densidade e poder de solvatação próximos a um líquido). O dióxido de carbono (CO_2) tem sido o fluido supercrítico mais utilizado devido à baixa toxicidade, baixo risco de combustão, ter parâmetros supercríticos facilmente atingíveis e ser disponível comercialmente. As vantagens desse tipo de cromatografia estão no fato de esse fluido ter alto poder de solubilização de líquidos a temperaturas bem mais baixas que as dos gases e na sua baixa viscosidade e densidade, o que confere alta taxa de transferência de massa, resultando em eficiência e velocidade semelhantes à CG.

É uma técnica bastante versátil, podendo-se utilizar colunas recheadas para separação conectadas a detectores de CLAE, ou ainda colunas capilares e detectores de CG. A instrumentação básica é composta de fonte de gás (cilindro de CO_2), bomba (que pressuriza o CO_2), controlador de pressão, injetor, coluna analítica e detector. Apesar de tudo, é uma técnica pouco utilizada devido ao alto custo e às limitadas opções de fluidos supercríticos. Seu maior emprego é na indústria farmacêutica como cromatografia preparativa de fármacos, já que essa técnica protege substâncias termicamente instáveis da decomposição, oxidação e outras reações indesejáveis. Além disso, resulta em boa resolução de compostos quirais.

A eletroforese também é uma técnica de separação, mas nesse caso a separação se dá pela pelo diferente movimento de partículas neutras ou moléculas carregadas eletricamente em um líquido condutor sobre a influência de um campo elétrico. Na Eletroforese Capilar (EC), a solução contendo eletrólitos e moléculas neutras é movida através de um capilar oco (geralmente de sílica fundida) localizado entre os dois eletrodos e é impulsionado pelo fluxo eletrosmótico (FEM). Esse fluxo é causado pela carga que se forma na parede do capilar devido à interação do líquido do interior do capilar com os grupos silanóis ou espécies iônicas adsorvidas no capilar. Ou seja, diferentemente da eletroforese em gel "clássica" que se baseia somente na migração diferencial devido à relação massa/carga dos compostos, na EC, o FEM exerce um papel importante, possibilitando, por exemplo, a movimentação de moléculas neutras na velocidade do fluxo. Cátions se moverão mais rapidamente que o FEM em direção ao cátodo. Já os ânions, apesar da atração pelo anodo, serão carregados pelo FEM em

direção ao cátodo, mas com velocidade de migração menor que os compostos neutros e muito menor que os cátions (Figura 2.18).

Figura 2.18 | Esquema de uma Eletroforese Capilar e representação do fluxo eletrosmótico dentro do capilar



Fonte: adaptada de Soares (2006).

O equipamento é simples e inclui um recipiente de amostra, os recipientes fonte e destino, contendo a solução com eletrólitos (onde são imersas as extremidades do capilar), o capilar, o detector, a fonte de alta tensão e o dispositivo de tratamento dos dados (Figura 2.18). A injeção da amostra é realizada transferindo-se o capilar para o recipiente da amostra. A aplicação de voltagem ou pressão sobre a amostra força seus componentes a migrarem para o capilar. Devido ao comprimento (geralmente, 40 cm) e ao diâmetro interno (25 a 75 μm) do capilar, nanolitros de amostra são injetados em EC. Vários detectores têm sido utilizados, como os de UV-Vis, fluorescência, espectrômetros de massas e refratômetros.

As colunas são baratas e duráveis e o custo da análise é baixo em razão do pequeno volume de solvente utilizado, das análises à

temperatura ambiente e de não ser necessária uma bomba no sistema. Permite separar compostos polares iônicos, polares não iônicos e não polares não iônicos. As separações são rápidas e eficientes, sendo comuns análises em 5 minutos e picos com até 500.000 pratos. Muito utilizado para separar vitaminas hidro e lipossolúveis, aminoácidos, ácidos orgânicos, fármacos diversos e proteínas.



Refleta

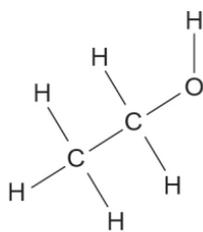
No decorrer desta Unidade 2, conversamos sobre as técnicas de separação mais utilizadas no mundo para análise de compostos diversos.

Considerando tudo que vimos, quais técnicas você utilizaria para separar: fragrâncias de um perfume; aflatoxinas de amostras de amendoim; ácido graxo de gordura de peixe; fármacos orgânicos polares de um medicamento; e vitaminas hidro e lipossolúveis em uma amostra alimentícia?

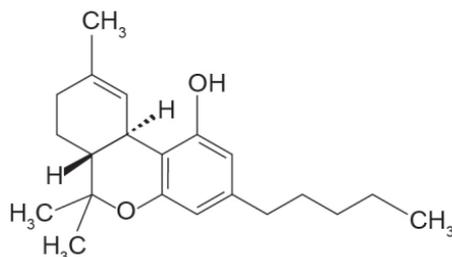
Sem medo de errar

Como vimos na situação-problema desta seção, o álcool etílico e os canabinoides (Figura 2.19) também são substâncias proibidas em muitas competições esportivas, configurando doping e suspensão da participação do atleta nas competições.

Figura 2.19 | Estrutura química do álcool etílico (I) e do THC (II), composto psicoativo mais importante da maconha



I



II

Fonte: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 16 maio 2017.

Luis foi consultado sobre a capacidade do seu laboratório de atender a uma demanda grande de análises desses compostos.

Em um primeiro momento, ele pensou que sim, afinal, ele dispunha em seu laboratório de vários cromatógrafos líquidos, alguns deles acoplados a espectrômetros de massas de última geração.

Mas quando ele e sua equipe começaram a estudar a estrutura química dos compostos e suas características, verificaram que o THC é um óleo viscoso, praticamente insolúvel em água. Essa característica lhe confere alta volatilidade, e pode ser observada no fato de que o consumo via inalatória (pulmonar) é a mais utilizada pelos usuários, por ter um início de ação rápido. Durante o consumo da maconha, em torno da metade do THC se perde durante a queima. Ainda, por ser altamente lipofílico, penetra muito facilmente no sangue e pode agir produzindo mudanças na membrana celular.

Outra informação que eles obtiveram sobre essa análise é que o THC adere com grande facilidade a superfícies de vidro e plásticas, gerando procedimentos laboratoriais mais trabalhosos. Ou seja, o preparo de amostras deveria ser bem pensado, de forma a evitar a perda por volatilização, ou ainda por aderência às superfícies utilizadas no preparo.

Em relação ao álcool etílico, se trata de uma molécula orgânica simples, cujos radicais hidroxil e etil lhe conferem propriedades tanto hidrofílicas como lipofílicas. Possui ponto de ebulição próximo aos 78°C e baixo peso molecular, caracterizando-se como o composto volátil majoritário da maioria das bebidas alcoólicas.

Essas características eram muito distintas das observadas nas outras moléculas analisadas no seu laboratório. Quando a equipe foi buscar mais informações na literatura, teve a confirmação de que a cromatografia líquida não resolvia todos os problemas analíticos de separação. Para esse tipo de amostras, era necessária uma técnica de análise de compostos voláteis ou facilmente volatilizáveis. E também era necessária uma técnica de preparo de amostra que garantisse que esses compostos voláteis não seriam perdidos durante o preparo.

Sem muita dificuldade a equipe concluiu que para ambos os casos, a técnica de cromatografia gasosa era a mais indicada. Inclusive essa é a mundialmente empregada para esse tipo de análise em fluidos biológicos.

Em relação à etapa de preparo e extração dos compostos dessas amostras, a extração por *headspace* é a mais recomendada. Nesse tipo de extração, a amostra pode ser agitada ou aquecida, favorecendo a volatilização dos compostos, que são adsorvidos em um material adequado. Posteriormente, esses compostos são desorvidos no injetor do cromatógrafo gasoso. Atualmente a *solid phase microextraction* (SPME) tem sido muito utilizada para extração e pré-concentração, com as vantagens de não utilizar solventes orgânicos, utilizar pequena quantidade de amostra e possibilitar a automação da análise e acoplamento com o CG.

E quanto ao detector a ser utilizado? O mais popularmente utilizado para análise de álcoois é o detector de ionização em chama, que é bastante sensível a moléculas orgânicas. No caso de limites de detecção menores e análises confirmatórias, pode ser necessário o acoplamento com um espectrômetro de massas. Para derivados da maconha, esse último tem sido o mais empregado.

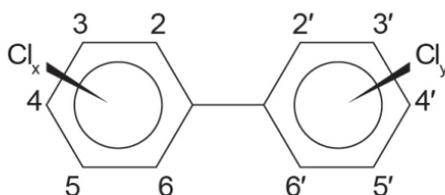
Avançando na prática

O problema das bifenilas policloradas

Descrição da situação-problema

Bifenilas policloradas (PCBs) são um grupo de compostos organoclorados sintéticos (Figura 2.20) amplamente empregados como fluido dielétrico em transformadores e capacitores, fluidos hidráulicos, retardadores de fogo e isolantes térmicos devido às propriedades de serem pouco reativos, não inflamáveis, termicamente estáveis e com alta resistência elétrica. De 1930 até 1993, ano em que parou a sua fabricação em escala mundial, foram produzidas mais de 1,3 milhões de toneladas de PCBs.

Figura 2.20 | Estrutura química dos PCBs.



Fonte: <<https://goo.gl/ozu8aU>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

Eles se encontram disseminados globalmente como poluentes do ar, da água, do solo e dos alimentos. Por serem lipofílicos, semivoláteis, quimicamente inertes e pouco biodegradáveis, têm grande propensão à persistência generalizada na natureza. Sofrem adsorção em sedimentos e na matéria orgânica do solo e da água, e acumulam-se na cadeia alimentar.

A contaminação de recém-nascidos pelo leite materno é de especial importância, assim como a transferência desses compostos para o feto através da placenta. Devido à sua natureza lipofílica, esses poluentes se concentram na gordura do leite materno e passam para o recém-nascido durante a amamentação justamente no período em que alguns órgãos ainda estão em desenvolvimento, como é o caso do fígado e do sistema nervoso.

Considerando o que estudamos nesta disciplina até agora, qual técnica cromatográfica você considera mais adequada para a quantificação de PCBs no leite materno? Quais são o tipo de coluna cromatográfica e o tipo de detector mais apropriados?

Resolução da situação-problema

Como podemos observar na Figura 2.20, a estrutura básica desses compostos é formada por dois anéis benzênicos ligados por uma ligação carbono-carbono simples. No processo de cloração, átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de cloro. Ao todo, 209 congêneres diferentes de PCBs são possíveis, apesar de nem todos terem sido fabricados comercialmente.

Vimos que são compostos lipofílicos, semivoláteis, quimicamente inertes e pouco biodegradáveis, tendo grande propensão à persistência generalizada na natureza. Essas informações nos ajudam a concluir que o sistema cromatográfico mais adequado para esse tipo de análise é a cromatografia gasosa, utilizando um gradiente de temperatura que permita a volatilização desses compostos. O sistema de detecção mais conveniente, devido à natureza química e às baixas concentrações dos PCBs nas diferentes matrizes, é o detector de captura de elétrons (GC-ECD), que apresenta especificidade para compostos halogenados. O espectrômetro de massa também é uma opção, já que permite o monitoramento seletivo das razões m/z de interesse. Em relação à coluna cromatográfica, pode-se empregar colunas

capilares que utilizam fases estacionárias apolares, tais como 100% dimetilpolisiloxano, ou ainda 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano.

Faça valer a pena

1. Na cromatografia gasosa, a separação dos componentes de uma amostra no estado de vapor ocorre devido à sua partição entre uma FM gasosa e uma FE líquida ou sólida. Ainda sobre a cromatografia gasosa, avalie as afirmações a seguir:

I. O detector de captura de elétrons é extremamente sensível aos hidrocarbonetos.

II. A resposta de um detector de ionização de chama para uma dada concentração pode variar de um composto para outro.

III. O gás de arraste tem a função de transportar os analitos através da coluna sem interagir com eles.

IV. Baixas temperaturas são, geralmente, empregadas nas separações por cromatografia gasosa.

Identificando as afirmações como verdadeiras (V) ou falsas (F), assinale a sequência correta.

a) V – V – F – V.

b) V – F – V – F.

c) F – V – F – V.

d) F – F – V – F.

e) F – V – V – F.

2. O uso generalizado e intensivo de agrotóxicos nas mais diversas culturas tem gerado diversos problemas relacionados à saúde pública e ao meio ambiente. Apesar da preocupação do governo com o monitoramento dos resíduos desses compostos em alimentos, nem todas as metodologias analíticas permitem a análise desses compostos com qualidade e rapidez.

Considerando o contexto apresentado, avalie as seguintes asserções e a relação proposta entre elas.

I. Para uma análise de cinco agrotóxicos (clorpirifós, endossulfam, permetrina, cipermetrina e deltametrina) em amostras de alface a melhor opção de instrumento é o cromatógrafo gasoso com injetor no modo *splitless*.
PORQUE

II. Os agrotóxicos estão presentes a nível de traços nas amostras alimentícias, sendo necessário injetar o maior volume possível de amostra. A respeito dessas asserções, assinale a alternativa correta.

- a) As asserções I e II são proposições verdadeiras, e a II é uma justificativa da I.
- b) As asserções I e II são proposições verdadeiras, mas a II não é uma justificativa da I.
- c) A asserção I é uma proposição verdadeira, e a II é uma proposição falsa.
- d) A asserção I é uma proposição falsa, e a II é uma proposição verdadeira.
- e) As asserções I e II são proposições falsas.

3. Inúmeros componentes fazem parte de qualquer instrumento laboratorial, por mais simples que ele seja. Alguns componentes são utilizados independentemente da técnica, por exemplo, um injetor de amostras e um detector. Outros são peculiares de cada técnica.

A seguir, estão descritos 6 (seis) componentes básicos de uma técnica analítica muito utilizada em laboratórios farmacêuticos:

1. Recipiente de amostra.
2. Recipientes contendo os eletrólitos.
3. Capilar.
4. Detector.
5. Fonte de alta tensão.
6. Tratamento dos dados.

Dentre as alternativas a seguir, assinale a que representa a técnica descrita.

- a) Cromatografia gasosa.
- b) Eletroforese capilar.
- c) Cromatografia líquida de alta eficiência.
- d) Cromatografia de fluido supercrítico.
- e) Coulometria de corrente controlada.

Referências

- BANDEIRA, Danieli Daiani et al. Determination of pesticide residues in bovine milk using a modified Quechers method and GC-MS/MS. **Química nova**, [s.l.], p. 900-907, 2014. Disponível em: <<http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/v37n5a21.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2017.
- BRASIL2016. **Como funciona o laboratório brasileiro de controle de dopagem**. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=NAMBdgpNj5M>>. Acesso em: 24 abr. 2017.
- CECCHI, Heloisa Mascia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.
- CHEMSPIDER. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 17 maio 2017.
- CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.
- CIOLA, Romulo. **Fundamentos da cromatografia líquida de alta eficiência**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.
- COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456p.
- EDUCADOR BRASIL ESCOLA. **Experimento em cromatografia em papel**. Disponível em: <<http://educador.brasilecola.uol.com.br/estrategias-ensino/experimento-cromatografia-papel.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- GIL, Eric de Souza et al. **Controle Físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511p.
- HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução: Célio Pasquini e colaboradores. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055p.
- IQOG-CSIC. **Cromatografia**: divulgação científica. 2012. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=W00OosxaPYs8>>. Acesso em 4 maio 2017.
- IQOG-CSIC. **El Cromatografo de gases**: divulgação científica. 2014. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=9nYpjtRx0Zs>>. Acesso em: 12 maio 2017.
- LABX. **Agilent 1200 LC**. Disponível em: <<http://www.labx.com/product/agilent-1200>>. Acesso em: 4 maio 2017.
- LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Atomo, 2002. 278p.
- MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**: instituto internacional de cromatografia, São Carlos, v. 3, n. 4, p.197-207, 2012. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/files/v4n3/v4n3a14.pdf>>. Acesso em: 4 maio 2017.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: 1. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**, v. 35, n. 12, p. 1358-1368, 1941. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1265645/pdf/biochemj00981-0076.pdf> >. Acesso em: 17 maio 2017.

MURTA, Antônio L. M. et al. Cromatografia Líquida ou Cromatografia com Gás? **Química nova**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 92-94, 1981. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol4No3_92_v04_n3_\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol4No3_92_v04_n3_(6).pdf)>. Acesso em: 17 maio 2017.

OEI. Junta de Andaluzia. **A química divina das fragrâncias**. Disponível em: <http://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica/reportajes_269.htm>. Acesso em 16 maio 2017.

OLIMPÍADA DE QUÍMICA SP-2014. **Laboratórios químicos espaciais**: da curiosidade humana à Mars Curiosity. Técnicas empregadas e importância científica. Disponível em: <http://allchemistry.iq.usp.br/oqsp/OQSP-2014-2-Angelo_Ardoonde.pdf>. Acesso em: 13 maio 2017.

PENTEADO, José Carlos Pires; VAZ, Jorge Moreira. O Legado das Bifenilas Policloradas (PCBs). **Química nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p.390-398, 2001. Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/publicacoes/quimicanova/qnol/2001/vol24n3/15.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

QUÍMICA INDUSTRIAL. **Cromatografia gasosa**: instrumentação. Disponível em: <<https://quimicainstrumental.wikispaces.com/5.3+Cromatografia+gasosa+-+instrumenta%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 17 maio 2017.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de química analítica**. Tradução: Robson Mendes Matos. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 950p.

SOARES, Lucia Valente. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 337p.

Métodos espectroscópicos

Convite ao estudo

Prezados aluno, como temos visto nas duas últimas unidades, esta disciplina tem como objetivo abordar as principais técnicas analíticas utilizadas na área farmacêutica e seus conceitos teóricos, os principais instrumentos e seus princípios de funcionamento, além das vantagens e limitações de cada uma.

Para dar início a essa etapa, vamos conhecer, a seguir, o Contexto de Aprendizagem a ser discutido nesta Unidade 3.

Maria Eduarda é uma graduanda do último ano do curso de Farmácia. Ela foi aprovada em um programa de estágio na área de controle de qualidade de uma grande indústria farmacêutica multinacional. Seu primeiro desafio foi acompanhar uma equipe de trabalho na avaliação de um novo fornecedor de princípios ativos, os quais serão utilizados caso aprovados pelo controle de qualidade e pela ANVISA, para formulação de anti-hipertensivos.

Na divisão de tarefas, Maria Eduarda ficou responsável por propor os possíveis métodos instrumentais a serem empregados para o doseamento do fármaco atenolol nesta matéria-prima, bem como para a avaliação das impurezas metálicas presentes. Como em outro projeto, liderado pelo mesmo gerente, seria realizado o decaimento plasmático do atenolol, ele pediu para Maria Eduarda investigar, ainda, o melhor método para a dosagem do fármaco no sangue.

Ela também percebeu que havia muito trabalho a ser realizado. A tarefa delegada a ela era essencial para o bom

andamento do projeto, já que os resultados advindos dos instrumentos e dos métodos selecionados por ela poderiam impactar em uma alteração (ou não) de fornecedor, e isso implicaria uma redução drástica no custo da aquisição dessa matéria-prima por parte da indústria. Além disso, se aprovada, essa matéria-prima passaria a ser utilizada para a produção de medicamentos em larga escala. Às vezes, na rotina do nosso trabalho como farmacêuticos, não paramos para pensar que cada decisão que tomamos impactará profundamente na vida de outras pessoas. Você já pensou sobre isso?

Nesta Unidade 3, intitulada Métodos Espectroscópicos, detalharemos os princípios das técnicas espectroscópicas mais importantes na nossa área. Na Seção 3.1, trataremos da espectroscopia de absorção molecular na região do visível e do ultravioleta; na Seção 3.2, da espectroscopia de luminescência molecular; e na Seção 3.3, da espectroscopia de absorção e emissão atômica. Além disso, conheceremos os principais instrumentos disponíveis no mercado e falaremos sobre a gama de aplicações na área farmacêutica. Vamos nessa?

Seção 3.1

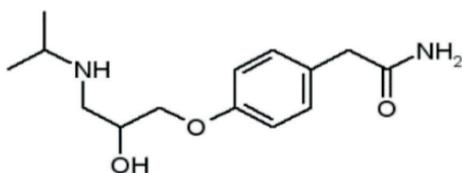
Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta e visível

Diálogo aberto

Caro aluno, no *Convite ao Estudo* desta Unidade 3, fomos apresentados a Maria Eduarda, uma graduanda do último ano do curso de Farmácia, que acabou de ser aprovada no programa de estágio na área de controle de qualidade de uma grande indústria farmacêutica. Seu primeiro desafio foi propor os possíveis métodos instrumentais a serem empregados para o doseamento do fármaco atenolol, em uma nova matéria-prima a ser testada, a qual é proveniente de um novo fornecedor.

A primeira coisa que ela fez assim que retornou para casa foi verificar suas anotações das aulas de Farmacodinâmica, para lembrar um pouco sobre esse fármaco. Viu que o atenolol (Figura 3.1) é o fármaco de primeira escolha empregado para o tratamento de doenças cardiovasculares, já que é cardiosseletivo e de longa duração de ação. É efetivo para o controle da hipertensão arterial, controle da angina *pectoris*, controle de arritmias cardíacas, tratamento do infarto do miocárdio e intervenção precoce e tardia após infarto do miocárdio.

Figura 3.1 | Fórmula molecular do atenolol



Fonte: adaptada de <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 26 maio 2017.

Dentre as metodologias para determinação do teor desse fármaco na matéria-prima, ela verificou a existência de várias abordagens, como a titulação potenciométrica, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, a cromatografia

em camada delgada, a CLAE, a eletroforese capilar, a espectrofotometria derivativa e a voltametria. Mas a grande pergunta foi: qual será o melhor?

Apesar de verificar que vários métodos poderiam ser utilizados, ela sabia que o seu desafio era maior que esse, pois tinha orientação prévia do seu supervisor para escolher uma ou duas metodologias, no máximo.

Então, ela resolveu buscar essa informação em uma das fontes mais confiáveis que ela conhecia: a Farmacopeia Brasileira.

Com base neste histórico, chegamos à nossa situação-problema: você poderia ajudar Maria Eduarda a encontrar essa informação na Farmacopeia Brasileira? Pesquise e identifique as metodologias recomendadas para o doseamento do atenolol. Quais são as condições experimentais recomendadas? Você poderia comentar brevemente o porquê da técnica e dos parâmetros analíticos escolhidos?

Contamos com você!

Não pode faltar

Os métodos espectrométricos consistem em um grande número de métodos analíticos baseados na espectroscopia atômica ou molecular. Eles podem ser resumidos como métodos que se baseiam na interação entre energia eletromagnética e matéria. Essa interação pode resultar em fenômenos, como absorção, emissão, fotodecomposição, reflexão, aquecimento, entre outros, e suas magnitudes dependerão das características tanto das moléculas como da energia radiante.

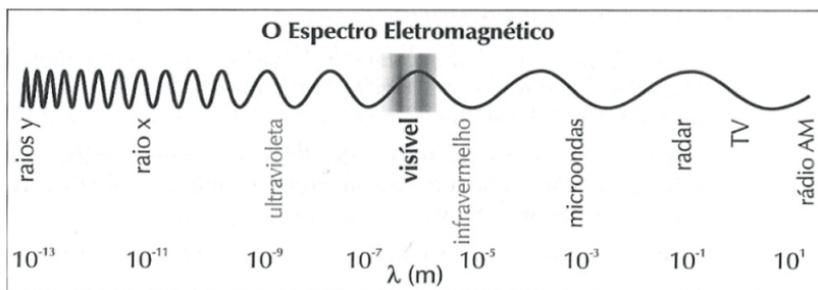


Assimile

Radiação eletromagnética pode ser definida classicamente como ondas eletromagnéticas que consistem em dois campos, um elétrico e um magnético, os quais sofrem oscilações senoidais em fase e na direção da propagação. Outra característica das ondas, descoberta mais recentemente, é sua capacidade de transportar energia e informações. Por isso, hoje existe uma visão dualística, chamada de dualidade onda-partícula: a radiação ora se comporta como onda (modelo ondulatório), ora como partícula (partículas discretas de energia chamadas fótons).

Na natureza, há inúmeras formas de radiação eletromagnética se propagando, conforme podemos verificar na Figura 3.2. Desde as ondas geradas pelos processos naturais, como a luz visível até as criadas pelo homem, até as ondas de rádio e TV ou raios X. Todas têm uma característica comum, são resultados das oscilações do campo elétrico e do campo magnético.

Figura 3.2 | Espectro eletromagnético



Fonte: Gil (2010).

A velocidade da propagação da onda depende da frequência (ν) e do comprimento de onda (λ), sendo a frequência determinada pela fonte de radiação, ou seja, constante. Já o comprimento de onda depende do meio de propagação, sendo a velocidade máxima da luz (c) obtida no vácuo ($3 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$), onde não ocorre interação com a matéria. Max Planck foi o primeiro a relacionar a frequência dos fótons (ν) com a energia (E) associada a cada um desses fótons, chegando à equação $E = h \cdot \nu$, em que E é a energia do fóton, h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e ν é a frequência. Sendo ν diretamente dependente da velocidade da luz (c) e inversamente a λ , temos que $E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$. Portanto, E é inversamente proporcional ao λ , ou seja, quanto menor o λ , maior a quantidade de energia necessária para a absorção.



Pesquise mais

As ondas eletromagnéticas são formadas por pequenos pacotes de energia denominados fótons. Eles são transferidos permanentemente entre objeto e meio, sempre que uma radiação é emitida ou absorvida. Esse fenômeno só foi explicado em 1905, por Einstein, quando

postulou sobre o efeito fotoelétrico. Para saber mais sobre o efeito fotoelétrico e sua comprovação experimental em 1916, por Millikan, acesse o link: <https://www.youtube.com/watch?v=_vBBpcJofj0>. Acesso em: 26 maio 2017.

As diferentes regiões espectrais têm significado importante nas interações físicas que se observam. Radiações menos energéticas têm efeitos mais suaves, como vibrações e rotações moleculares, observadas nas regiões do infravermelho e micro-ondas. Já as radiações mais energéticas apresentam efeitos ionizantes, podendo causar mutações e fissões nucleares no caso de raios gama (γ).

Quando a radiação passa por um sólido, líquido ou gás, certas frequências podem ser absorvidas, um processo pelo qual a energia eletromagnética é transferida para os átomos que compõem a amostra. A absorção promove essas partículas do seu estado fundamental (E_0) para um ou mais estados excitados (E_1 ou E_2). Conforme a teoria quântica, os átomos apresentam somente um número limitado de níveis de energia discretos. Para que a absorção ocorra, a energia do fóton de excitação deve ser exatamente igual à diferença entre os estados fundamental e excitado, sendo essas diferenças únicas para cada espécie. Assim, quando átomos absorvem ou emitem radiação, ao realizarem a transição entre estados, a ν ou λ da radiação é relacionada com a diferença de energia entre os estados: $E_1 - E_0 = \frac{h \cdot c}{\lambda}$.



Assimile

Quando um átomo recebe energia radiante, ele passa do E_0 para o E_1 ou E_2 , e teremos um espectro de absorção. Por outro lado, quando um átomo cede o excesso de energia e volta ao E_0 , teremos um espectro de emissão. Lembre-se:

$E_0 + E = E_1$ ou E_2 e espectro de absorção.

E_1 ou $E_2 - E = E_0$ e espectro de emissão.

Os métodos espectroscópicos podem ser classificados de diferentes formas, mas a mais comum é quanto à característica da radiação observada. Métodos como fluorimetria, fluorescência atômica e plasma por acoplamento indutivo (ICP) se baseiam no fenômeno da emissão da radiação, enquanto métodos como absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), infravermelho, ressonância magnética nuclear e absorção atômica se baseiam no fenômeno da absorção da luz. Nesta unidade, falaremos especificamente sobre a espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis.



Assimile

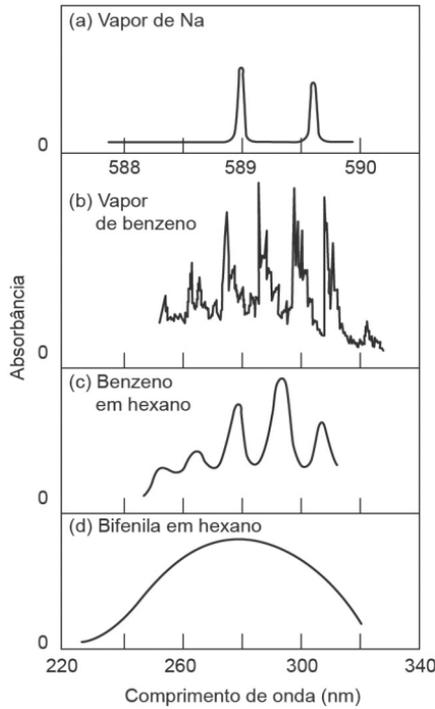
Uma importante distinção a ser feita é entre as técnicas de absorção atômica e absorção molecular no UV-Vis.

Absorção atômica: radiação policromática passa por um meio constituído de partículas monoatômicas (Hg, Na), poucas frequências bem definidas são absorvidas, gerando picos estreitos, já que são poucos os números de estados energéticos presentes.

Absorção molecular: radiação monocromática, vários estados energéticos, gerando várias bandas de absorção. Ainda, para cada nível eletrônico, existem vários vibracionais e, para cada vibracional, vários rotacionais.

A absorção da radiação UV-Vis por moléculas ocorre, geralmente, em uma ou mais bandas de absorção eletrônicas, cada uma formada por linhas muito próximas, porém discretas. Cada linha resulta da transição de um elétron do E_0 para um dos estados de energia vibracional e rotacional associados a cada estado eletrônico excitado. Como há muitos desses estados e suas energias diferem muito pouco, muitas linhas bem próximas estão contidas em uma banda típica. Isso pode ser visualizado quando analisamos uma mesma estrutura na forma de vapor (molécula individual, espectro cheio de picos) em um solvente não polar (bandas) e em solução aquosa (única banda de absorção). Na Figura 3.3, podemos ver claramente essa diferenciação.

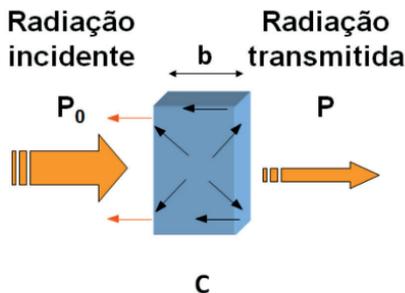
Figura 3.3 | Espectros de absorção típicos de absorção no UV-Vis



Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

O fenômeno de absorção requer duas medidas: uma antes do feixe passar pelo meio que contém a amostra com o analito (radiação incidente, P_0), e outra depois (radiação transmitida, P), conforme a Figura 3.4.

Figura 3.4 | Radiação eletromagnética interagindo com uma solução de amostra



Fonte: elaborada pelo autor.

A fração da radiação incidente transmitida pelo meio é chamada de Transmitância (T), enquanto que a fração absorvida é chamada de Absorbância (A). A relação entre A e T é dada por $A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T$.

Para uma radiação monocromática, A é diretamente proporcional ao caminho (b) percorrido pela radiação através do meio e a concentração (C) da espécie absorvente. Assim, temos a Lei de Beer, $A = a.b.C$, sendo a a absorvidade do meio. A absorvidade refere-se sempre a substâncias puras por tratar-se de uma propriedade física específica de cada substância.



Exemplificando

Quando nenhuma luz é absorvida, $A=0$, pois P_0 é igual a P e \log de 1 é 0.

Se 90% da luz é absorvida, T é 10%, e $A=-\log 0,1$, logo $A=1$.

Se 1% da luz é transmitida, T é 1%, e $A=-\log 0,01$, logo $A=2$.

Para fins experimentais, sempre se compara a T ou A de uma amostra com a de um solvente, utilizando as mesmas condições experimentais. Assim, P_0 passa a ser a radiação após passar pelo solvente, e P após passar pela amostra. Realizando a medida dessa forma é possível eliminar os fenômenos de reflexão, espalhamento e absorção das paredes do recipiente.

A Lei de Beer também pode ser aplicada para misturas contendo mais de uma substância, desde que não interajam entre si. A obediência à Lei de Beer pressupõe radiação monocromática, o comprimento de onda escolhido coincida com o máximo de absorção da substância, meio homogêneo, ausência de interferentes e espécies absorventes independente das demais. Geralmente, encontra-se uma relação direta entre absorbância (A) e caminho óptico (b), mas o mesmo não vale para concentração (C) quando b é constante. Isso ocorre devido aos desvios da Lei de Beer, ou ainda pelo uso de células desiguais. Os desvios podem ser:

- Desvios reais: em concentrações altas, as interações soluto-soluto ou soluto-solvente podem afetar sua absorvidade. A

distância média entre as moléculas diminui a ponto de cada partícula afetar a distribuição eletrônica da vizinhança, afetando a capacidade de o analito absorver em determinado λ . Desvios também podem ocorrer em baixas concentrações do analito e em altas concentrações de outras espécies.

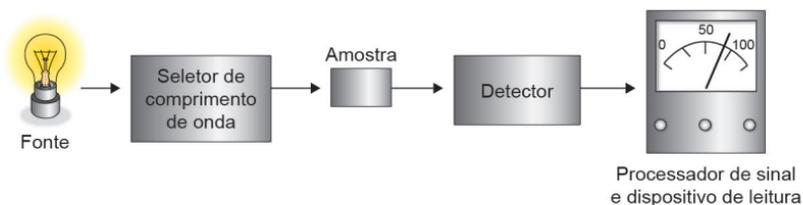
- Desvios químicos: ocorrem quando um analito se associa, dissocia ou reage com um solvente para formar um produto com um espectro de absorção diferente daquele do analito.

- Desvios instrumentais devido à radiação policromática: a lei se aplica às monocromáticas, por isso são usados filtros e grades para isolar a banda escolhida. Porém, quando a radiação não é monocromática, a potência do feixe que emerge da amostra é a soma das potências dos λ que emergiram, ou seja, se a absorvidade for diferente, a lei não é obedecida. Por isso, é importante selecionar o λ correspondente à banda de absorção máxima, no qual a E do analito é constante.

- Desvios instrumentais devido à radiação espúria: é a radiação que provém do instrumento. Ocorrem devido ao espalhamento e à reflexão nas janelas e grades. Em altas concentrações e longos percursos, a radiação espúria pode causar desvios na relação linear entre A e b.

Depois de conhecer um pouco sobre os princípios envolvidos nas medidas espectroscópicas, vamos conhecer os constituintes de um instrumento para medidas espectrais no UV e visível. Eles são constituídos de fonte, seletor de λ , recipiente para a amostra, transdutor de radiação (detector) e processador de sinal e leitura (Figura 3.5).

Figura 3.5] Componentes de um instrumento óptico simples utilizado para medidas de absorção

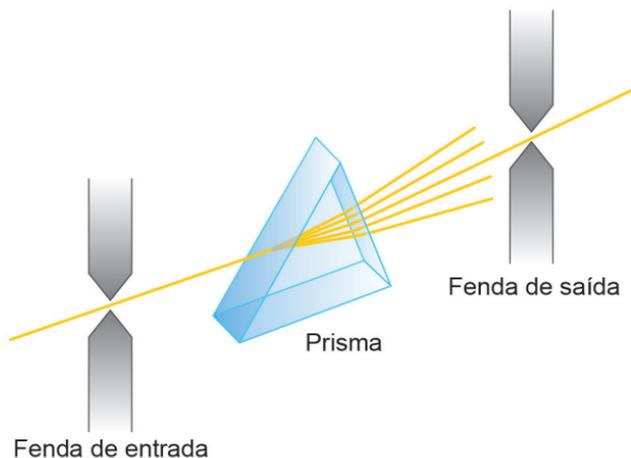


Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

- Fonte: utilizam-se fontes contínuas, cuja potência radiante não sofra variações bruscas em uma faixa considerável de λ . Para a região do visível, as mais utilizadas são de tungstênio (350 a 2500 nm) ou de xenônio (200 e 1000 nm). Já para a região do UV, geralmente, são utilizadas as lâmpadas de deutério e hidrogênio, as quais produzem espectros contínuos na região de 190-400 nm. O deutério produz uma esfera de radiação um pouco mais intensa, por isso, em geral, é a fonte escolhida.

- Seletor de comprimento de onda: são dispositivos com a função de selecionar uma banda (limitado, estreito e contínuo conjunto de λ) ou, idealmente, um único λ , o que não é possível na prática. Os mais simples são os filtros de absorção, que absorvem porções selecionadas do espectro visível, sendo, geralmente, vidros coloridos, ou os filtros de interferência destrutiva ou construtiva entre ondas. No entanto, os mais interessantes de serem utilizados são os monocromadores, que permitem variar continuamente o λ em uma faixa ampla, um processo chamado de varredura. São constituídos de uma fenda de entrada, uma lente ou um espelho que produz um feixe paralelo, um elemento dispersante da radiação (prisma ou rede de reflexão), uma lente ou um espelho que focaliza novamente a imagem e uma fenda de saída (Figura 3.6).

Figura 3.6 | Componentes de um monocromador com elemento dispersivo de prisma



Fonte: Soares (2006).

A qualidade dos monocromadores depende da pureza do espectro de saída, do ângulo de dispersão do monocromador, do poder de resolução entre imagens adjacentes com pequena diferença de λ , do poder de coleta de luz dos monocromadores e da largura da banda espectral.

- Recipiente para amostra: para trabalhar na região do UV (abaixo 350 nm) são necessárias cubetas de quartzo ou sílica fundida. Acima disso, pode-se usar vidro ou plástico. As cubetas, geralmente, têm 1,0 cm de espessura.

- Detectores: convertem a energia radiante em um sinal elétrico. Devem ter alta sensibilidade, alta relação sinal/ruído, uma resposta constante ao longo de uma ampla faixa de λ , tempo de resposta rápido e sinal elétrico diretamente proporcional à potência radiante. Existem os Transdutores de Fótons, os quais apresentam uma superfície ativa que absorve a radiação e, depois, emite elétrons, produzindo uma fotocorrente. Esses podem ser do tipo células fotovoltaicas, fototubos a vácuo, tubos fotomultiplicadores, fotodiodos de silício, entre outros. Existem, também, os Transdutores de Fótons Multicanal, que consistem de um arranjo de pequenos elementos fotossensíveis posicionados linearmente ou em um padrão bidimensional (matriz) sobre um chip de silício com um circuito eletrônico. Os mais comuns são os PDA (arranjos lineares de diodos).

- Processadores de sinal: ampliam o sinal elétrico produzido por um detector.

Quanto aos tipos de instrumentos, existem os de feixe único, os de feixe duplo e os multicanais.

Os de feixe único consistem em uma lâmpada de tungstênio ou deutério, um filtro ou monocromador, recipientes de amostra com características mais próximas possíveis, transdutor e amplificador. Nos de feixe duplo, dois feixes de radiação são formados no espaço por um espelho divisor de feixes: um passará pela amostra simultaneamente ao outro, que passa pela cela de referência. Cada feixe passa por um fotodetector, e um amplificador faz a diferença de leitura. Existem ainda os de feixe duplo separados pelo tempo, em que o feixe é enviado alternativamente à cela de referência e amostra, antes de alcançar o fotodetector. Os de feixe duplo oferecem a vantagem de compensar flutuações na intensidade da fonte, bem como demais flutuações no sistema.

Por último, existem os multicanais, também chamados de arranjos de diodos ou PDAs, descritos acima. Esses podem ser de feixe único, em que o sistema dispersivo é um espectrógrafo de grade localizado após a célula da amostra ou referência. A corrente escura do arranjo e o espectro da fonte são obtidos e guardados na memória. Finalmente, o espectro bruto da amostra é obtido e subtraído da corrente de escuro. Os valores da amostra, após subtração da corrente de escuros, são divididos pelos valores da fonte a cada λ para fornecer a absorvância. Também, podem ser de feixe duplo com feixes separados no tempo. A grande vantagem dos PDAs é que permitem obter espectros inteiros em milissegundos. Trata-se de uma ferramenta poderosa para estudo de intermediários de reação, estudos cinéticos e determinação quali e quanti dos componentes eluídos de uma coluna cromatográfica ou eletroforética. Os principais equipamentos comerciais disponíveis são os colorímetros, os fotômetros no UV e os espectrofotômetros.

Os colorímetros, ou fotômetros, atuam somente na região do visível. São simples e baratos, apresentam características de emissão intensa de radiação e, assim, boas relações sinal-ruído. Os de filtro podem ser portáteis e são bastante utilizados em laboratórios de análises clínicas. Existe o tipo sonda, no qual uma fibra óptica transmite a luz da fonte para a solução. Mergulha-se a sonda no solvente e, depois, na solução. Existem diversos filtros comerciais, e a maioria dos instrumentos permite a troca do filtro. No caso de desenvolvimento de um novo método, geralmente, usa-se um espectrofotômetro de varredura para identificar o ponto de absorção máxima e, após, usa-se o colorímetro de filtro adequado.

Os fotômetros no UV são, de modo geral, utilizados como detectores da CLAE, como já estudamos na Unidade 2. Também, são usados para monitorar baixas concentrações de fenol em água, cloro, mercúrio ou aromáticos em gases.

Os espectrofotômetros permitem a obtenção de espectros. Existem os que atuam só na região do visível, utilizando o filamento de tungstênio, mas a maioria atua em todo UV-Vis (lâmpadas intercambiáveis de tungstênio e deutério), podendo ser feixe único, feixe duplo ou multicanais. Em todos os casos, a radiação passa pela fenda de entrada em direção ao monocromador, a rede

de reflexão difrata a radiação e a banda selecionada passa pela fenda de saída em direção à amostra ou referência. É necessário o ajuste do 0% de T (sem radiação) e do 100% de T (com solvente e fenda aberta). Finalmente, a amostra é colocada e a % de T ou A é medida.

Frequentemente, a identidade de grupos absorventes pode ser determinada pela comparação do espectro de um analito com aquele de moléculas simples contendo grupos cromóforos. As medidas qualitativas, geralmente, são realizadas com soluções diluídas do analito. Mais comumente usam-se amostras líquidas e, além de considerar sua transparência, também se deve cuidar com os efeitos do solvente. Solventes polares tendem a suprimir estruturas espectrais fins resultantes dos efeitos vibracionais, proporcionando espectros com menos informações. Já solventes não polares permitem espectros com mais detalhes. O máximo de absorção também pode ser afetado pelo solvente, devendo sempre ser usado o mesmo solvente para diluir um padrão e uma amostra. É importante verificar o ponto de corte do solvente, que é o limite inferior de λ , a partir do qual o solvente pode ser utilizado. No caso de medidas no visível, qualquer solvente incolor é apropriado.

Medidas quantitativas de qualquer composto orgânico contendo um ou mais grupos cromóforos são viáveis. Espécies inorgânicas também absorvem radiação UV-Vis e podem ser quantificadas, bem como espécies não absorventes que reagem seletivamente com absorventes para formar produtos que absorvem fortemente. Como em qualquer procedimento quantitativo, é necessário garantir uma relação reprodutível entre A e C. Isso envolve a seleção adequada do λ (máximo de absorção), cuidados com a natureza do solvente, temperatura, interferentes, limpeza e manuseio das células.

Para a análise quantitativa, usualmente, se utilizam padrões externos para confecção de uma curva. Pode-se utilizar o método de adição-padrão para minimizar o efeito da matriz que pode causar alteração na inclinação da curva. É possível, também, quantificar misturas, desde que espectros de soluções padrão de cada componente de estudo sejam obtidos separadamente. Assim, é possível determinar o λ_{max} de absorção de cada componente.

Obviamente, essas espécies não podem interagir, pois à medida que aumenta o número de espécies, a incerteza se torna maior. Instrumentos do tipo PDA permitem a obtenção de espectros com incerteza reduzida devido ao tipo de processamento realizado.

Inúmeras são as aplicações dos métodos de absorção no UV-Vis na área farmacêutica. Além da análise de fármacos, excipientes e impurezas, também são muito utilizados nas análises clínicas e na área de alimentos, na determinação de vitaminas, pesticidas, conservadores, antioxidantes, pigmentos, entre outros compostos.



Refleta

Após concluir o estudo desta seção, quais características você levaria em consideração ao escolher um espectrofotômetro para aquisição?

Sem medo de errar

Caro aluno, no *Diálogo Aberto* desta seção, conhecemos a história hipotética de Maria Eduarda, graduanda do curso de Farmácia, que acabou de ser aprovada no programa de estágio na área de controle de qualidade de uma grande indústria farmacêutica. Seu primeiro desafio como parte da equipe era propor um ou dois métodos instrumentais que poderiam ser empregados para o doseamento do fármaco atenolol em uma nova matéria-prima proveniente de um novo fornecedor.

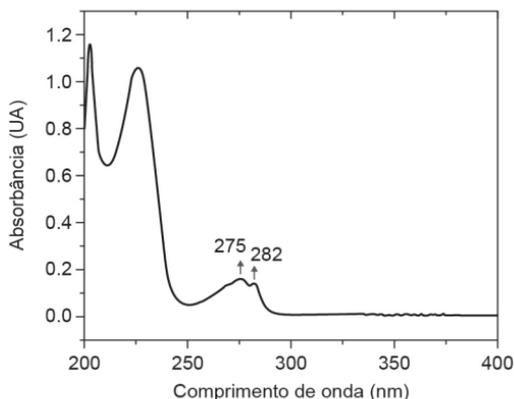
Em uma pesquisa detalhada em artigos científicos da área, ela verificou que vários métodos poderiam ser utilizados, como a titulação potenciométrica, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, a CLAE, a eletroforese capilar, entre outros. Ela também sabia que, no laboratório, todos esses equipamentos estavam disponíveis para serem utilizados. Eram muitas opções, mas quais eram as melhores? Então, ela resolveu buscar essa informação em uma das fontes mais confiáveis que ela conhecia: a Farmacopeia Brasileira.

Nosso desafio nesta situação-problema é buscar essa informação na Farmacopeia, bem como descrever brevemente as condições experimentais recomendadas e discorrer sobre a análise proposta. Para ajudá-la, utilizaremos a 5ª edição, volume 2, da Farmacopeia Brasileira 2 (ANVISA, 2010).

Como sabemos que o produto é a matéria-prima (e não o produto processado), vamos verificar a monografia do Atenolol (Atenololum) com características físicas de pó cristalino. A característica de solubilidade é muito pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em ácido acético glacial e etanol, pouco solúvel em cloreto de metileno, muito pouco solúvel em acetona, praticamente insolúvel em acetonitrila. Para identificação de três métodos, são sugeridos absorção no infravermelho, absorção no ultravioleta ou cromatografia em camada delgada. Também, observamos que, para diluir a amostra, tanto para análise no método cromatográfico como espectrométrico, é sugerido o uso de metanol. Quando observamos a parte referente ao doseamento, vemos, então, os dois métodos sugeridos: Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e CLAE.

No primeiro método, a Farmacopeia sugere pesar 25 mg da amostra e dissolver em 50 mL de metanol. Em seguida, diluir, sucessivamente, em metanol, até concentração de 0,01 % (p/v). O método também sugere padrões externos na mesma faixa de concentração, utilizando o mesmo solvente. Em seguida, medir as absorbâncias das soluções em 275 nm, utilizando metanol para o ajuste do zero e calcular o teor do atenolol na amostra, a partir das leituras obtidas. Na Figura 3.6, temos um espectro de uma matéria-prima de atenolol na concentração de 0,01 % (p/v) diluída em metanol. É possível verificar o máximo de absorção em 275 nm.

Figura 3.6 | Espectro obtido de uma matéria-prima de atenolol utilizando metanol como solvente



Fonte: Anderson (2015).

Em relação à CLAE, sugere-se o uso de detector ultravioleta a 226 nm, em que também se observa um máximo de absorção, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 μm), mantida à temperatura ambiente. O fluxo da fase móvel é de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e a fase móvel é constituída de 1,1 g de heptanossulfonato de sódio e 0,71 g de fosfato de sódio dibásico anidro dissolvidos em 700 mL de água (pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico SR), 300 mL de metanol e 2 mL de dibutilamina. Amostra e soluções padrão são dissolvidas na fase móvel de modo a obter soluções de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Recomenda-se injetar replicatas de 10 μL da solução padrão. A eficiência da coluna não deve ser menor que 5000 pratos. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não pode ser maior que 2,0%. O teor de atenolol na amostra é calculado a partir das respostas obtidas com a solução padrão e a solução amostra.

Assim, após verificar os métodos farmacopeicos sugeridos e, mais importante ainda, entender o que estava sendo proposto, Maria Eduarda ficou tranquila em apresentar os resultados da sua pesquisa para a empresa.

Avançando na prática

Doseamento de fósforo em soro

Descrição da situação-problema

Certo laboratório de análises clínicas recebeu uma amostra de soro para doseamento de fósforo. O analista recebeu a informação de que o equipamento geralmente utilizado para essa análise era o único espectrofotômetro UV-Vis disponível no laboratório. Entretanto, ele apresentou problemas na última semana e havia sido retirado de uso. Assim, o único equipamento óptico disponível era um fotômetro no visível.

Considerando que a leitura do fósforo no espectrofotômetro sempre foi realizada em 660 nm, você recomenda ao analista realizar essa análise no fotômetro no visível?

Resolução da situação-problema

O analista resolveu pesquisar um pouco sobre essa determinação e descobriu que os valores de referência para adultos variava de 2,7 a 4,5 mg.dL^{-1} ; para crianças, de 4,5 a 5,5 mg.dL^{-1} ; e para recém-nascidos, de 3,5 a 8,6 mg.dL^{-1} .

Verificou, também, que a determinação desse composto no soro é importante para o diagnóstico de hiperfosfatemia e hipofosfatemia. A hiperfosfatemia é encontrada em hipoparatiroidismo, fraturas ósseas em consolidação, tratamento citotóxico de certas leucemias e linfomas, tumores ósseos, entre outras doenças. Já a hipofosfatemia está presente nas deficiências de vitamina D, por exemplo, raquitismo, hiperparatiroidismo, uso crônico de antiácidos, alcoolismo crônico e síndromes de má-absorção.

O princípio do método utilizado no laboratório era o método de Goldenber e Fernandes. Nele, o soro é desproteinizado com ácido tricloroacético contendo íon ferroso e tiourea. Então, o sobrenadante é misturado com o ácido molíbdico para formar o fosfomolibdato, que é reduzido pelo íon ferroso, produzindo o azul de molibdênio. A leitura é feita em 660 nm.

Verificando o espectro eletromagnético, ele percebeu que esse comprimento de onda corresponde à região do visível. Assim, essa determinação poderia ser realizada no fotômetro no visível. No entanto, todos os cuidados referentes ao tipo de lâmpada, tipo de cubeta e tipo de filtro devem ser tomados, bem como a verificação quanto às condições de calibração, manutenção do equipamento e controle de qualidade analítica.

Faça valer a pena

1. Quando um átomo ou molécula absorve energia na forma de radiação e passa do estado _____ (I) para o estado _____ (II), observa-se um espectro de _____ (III). Quando a molécula cede essa energia e volta ao estado _____ (IV), observa-se um espectro de _____ (V).

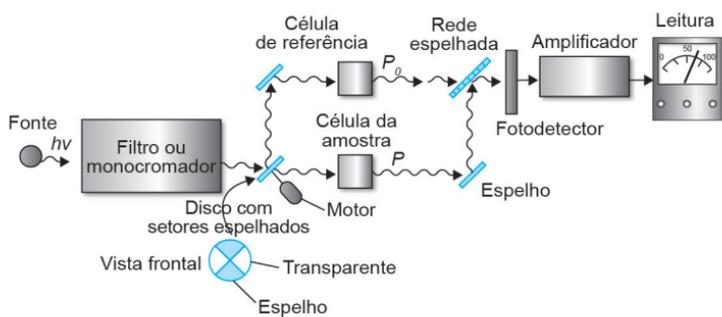
As lacunas I, II, III, IV e V serão corretamente preenchidas por:

- a) Fundamental, excitado, emissão, fundamental, absorção.
- b) Fundamental, excitado, absorção, fundamental, emissão.
- c) Excitado, fundamental, emissão, excitado, fluorescência.
- d) Excitado, fundamental, absorção, excitado, emissão.
- e) Excitado, fundamental, fluorescência, excitado, absorção.

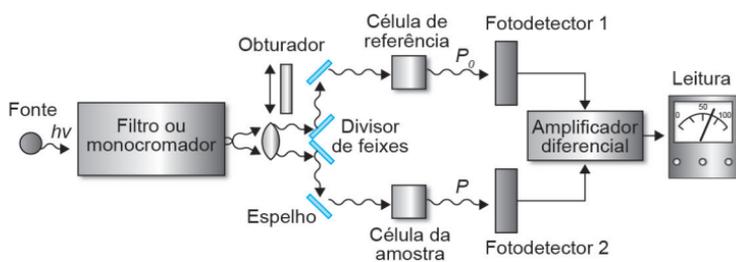
2. A Lei de Lambert-Beer, comumente conhecida como Lei de Beer, $A = a.b.C$, é utilizada para medir a absorvância de uma radiação que passa em uma amostra contendo os analitos de interesse. No entanto, essa equação é válida somente em algumas condições específicas de medição. Dentre as alternativas a seguir, assinale a que representa somente condições válidas para a aplicação da Lei de Beer.

- a) Radiação incidente monocromática, meio heterogêneo e soluções concentradas.
- b) Radiação incidente policromática, meio heterogêneo e espécies absorventes independentes.
- c) Radiação incidente monocromática, meio homogêneo e soluções diluídas.
- d) Radiação incidente policromática, meio homogêneo e espécies absorventes dependentes.
- e) Espécies absorventes independentes, ausência de interferentes e soluções concentradas.

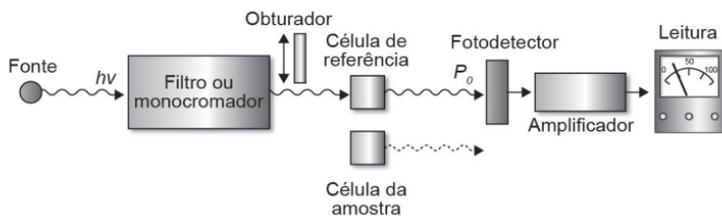
3. Os principais equipamentos comerciais disponíveis para realizar as medidas de absorção na região do ultravioleta ou do visível são os colorímetros, os fotômetros no UV e os espectrofotômetros. Eles podem ser do tipo feixe único, feixe duplo separados no espaço, feixe duplo separados no tempo ou multicanais. Na figura a seguir, são apresentados alguns dos tipos existentes:



I



II



III

Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Os esquemas identificados como I, II e III correspondem, respectivamente, aos instrumentos:

- Multicanal, de feixe duplo separado no tempo e de feixe duplo separado no espaço.
- Multicanal, de feixe duplo separado no espaço e de feixe único.
- De feixe único, multicanal e de feixe duplo separado no tempo.
- De feixe duplo separado no espaço, de feixe duplo separado no tempo e de feixe único.
- De feixe duplo separado no tempo, de feixe duplo separado no espaço e de feixe único.

Seção 3.2

Espectroscopia de luminescência molecular

Diálogo aberto

No *Convite ao Estudo* desta Unidade 3 fomos apresentados a Maria Eduarda, uma graduanda do curso de Farmácia, que foi aprovada no programa de estágio de uma grande indústria farmacêutica.

Seu primeiro desafio foi acompanhar uma equipe de trabalho na avaliação de um novo fornecedor do fármaco atenolol. Caso aprovado, o custo de produção dos medicamentos com esse ativo cairia bastante, o que poderia representar lucro maior para a empresa e possível queda no valor da venda do produto.

Além do doseamento do fármaco atenolol nesta matéria-prima, ela ficou responsável por propor métodos para a avaliação das impurezas metálicas presentes, e também métodos para a dosagem deste fármaco no sangue.

Em relação às impurezas metálicas, ela ainda estava bastante confusa, pois não sabia qual a melhor técnica para análise de compostos inorgânicos. No entanto, em relação à dosagem do atenolol no sangue, ela estava certa de que as mesmas técnicas utilizadas para dosar o fármaco no medicamento serviriam para realizar a dosagem no sangue, que eram a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Assim, chegamos à situação-problema desta seção: você concorda com ela que um método baseado na espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, com ou sem acoplamento a um sistema CLAE, seria um método adequado para dosar esse composto no sangue? Justifique sua resposta e, caso não concorde, proponha uma técnica que, no seu ponto de vista, seja mais adequada.

Não pode faltar

As técnicas analíticas baseadas nos fenômenos de luminescência são muito úteis na determinação de constituintes de alimentos em baixas concentrações, algumas vitaminas, vários fármacos, contaminantes, entre outras análises, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A alta sensibilidade ocorre porque o detector funciona contando fótons emitidos em uma solução “às escuras”. Em contraste, no caso das medidas de absorvância no UV-Vis, é medida a diferença de luminosidade de uma fonte que passa por uma ou duas soluções. Um detector terá uma sensibilidade muito maior em contabilizar a radiação de um sinal fraco do que a diferença entre dois sinais intensos. Assim, as medidas baseadas na luminescência podem ser de 10 a 100 vezes mais sensíveis do que as baseadas na absorvância, proporcionando baixos limites de detecção (LODs) e uma grande faixa linear. A alta especificidade deriva do fato de que o fenômeno da fluorescência não ocorre em todas as substâncias orgânicas e, também, dois espectros de um mesmo composto são medidos, o de excitação e o de emissão, e ambos são característicos daquela molécula.



Exemplificando

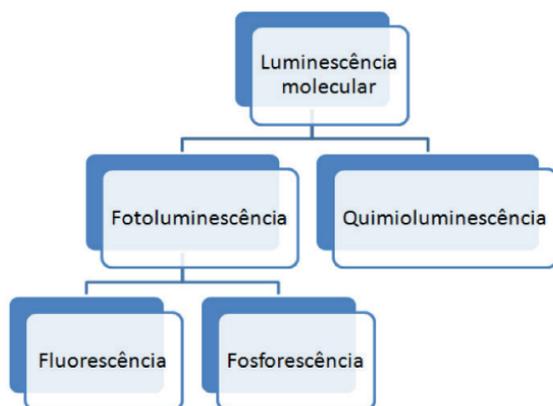
Numerosas substâncias apresentam fluorescência natural, dentre elas a fluorita ou fluoreto de cálcio (de onde provém o nome do fenômeno), os vidros de urânio, as soluções de fluoresceína e eosina, além de diversos corantes, sulfato de quinino, clorofila, vapores de sódio e mercúrio, iodo e acetona.

Vamos, agora, relembrar alguns conceitos já estudados na Seção 3.1 e introduzir novos conceitos que nos ajudarão nesta seção. Como vimos, os átomos existem somente em estados discretos, caracterizados por quantidades de energia definidas. Quando uma espécie altera seu estado, ela absorve ou emite energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados, conforme a equação $E_1 - E_0 = \frac{hc}{\lambda}$, a qual já estudamos.

Ao retornar ao estado fundamental (E_0), a perda dessa energia acumulada pode ocorrer devido à emissão de um fóton, por colisão

com outras espécies presentes ou por relaxamento vibracional. Quando ocorre emissão de luz, o fenômeno é conhecido como luminescência e, dependendo da fonte que gerou a espécie excitada, podemos ter a fotoluminescência (fonte: radiação eletromagnética) ou a quimioluminescência (fonte: reação química) (Figura 3.7).

Figura 3.7 | Classificação dos fenômenos luminescentes



Fonte: elaborada pelo autor.

Na fotoluminescência, ao retornarem ao E_0 , as moléculas emitem radiação, a qual pode ser fluorescente ou fosforescente. No caso da fluorescência, quando a radiação responsável pela excitação é retirada, a emissão cessa imediatamente, o que indica que as transições de energia envolvidas não provocaram mudança no *spin* eletrônico. Já no caso da fosforescência, a emissão da radiação continua após a excitação haver cessado, podendo durar vários segundos. Ocorre inversão no *spin* do elétron e a desativação do estado tripleto para o E_0 é lenta.



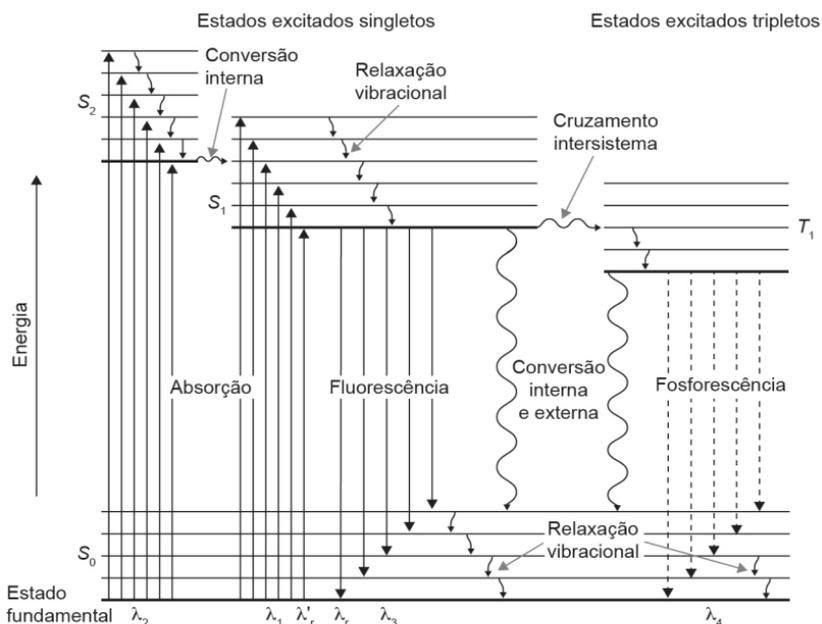
Assimile

A fluorescência e a fosforescência são fenômenos semelhantes, uma vez que para ambas a excitação é feita pela absorção de fótons. A diferença está nas transições eletrônicas envolvidas, já que na fluorescência não ocorre mudança de *spin*, ou seja, o tempo de vida do estado excitado é curto, e na fosforescência ocorre alteração

no *spin* e, assim, o tempo de vida é mais longo. Nos dois casos, o fenômeno da fotoluminescência ocorre em λ maiores do que os da radiação de excitação.

O exemplo mais simples para entendermos o fenômeno da luminescência é o de uma espécie atômica em estado de vapor. No caso do vapor de sódio, elétrons 3s podem ser excitados a 3p, mediante absorção de fótons na região de 590 nm. Após um tempo de vida da ordem de 18-8 s, eles retornam ao 3s emitindo os mesmos λ (conhecido como radiação ressonante). No caso da fluorescência molecular que estudaremos aqui, ocorrem muitas sobreposições entre os diferentes estados energéticos, tornando a emissão muito mais complexa e em λ maiores devido aos demais fenômenos observados, conforme Figura 3.8.

Figura 3.8 | Diagrama de níveis de energia para um sistema fotoluminescente (Diagrama de Jablonski)



Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Como pode ser observado na Figura 3.8, uma molécula excitada pode retornar ao E0 de diversas formas, sendo a trajetória favorecida a que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, podem ocorrer, além da fluorescência e da fosforescência, os processos não radioativos. De forma resumida, apresentamos, no Quadro 3.1, os processos que podem ocorrer durante o retorno de uma molécula excitada ao seu estado fundamental.

Quadro 3.1 | Processos radioativos e não radioativos

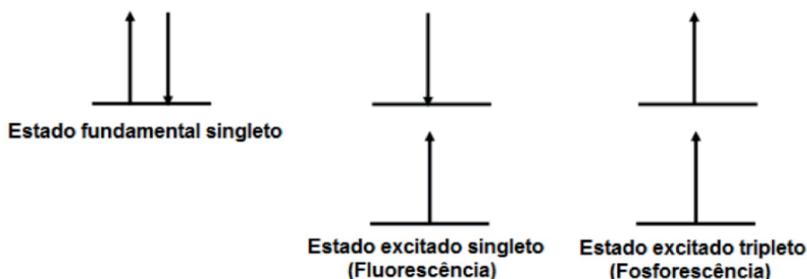
Fluorescência	Emissão de um fóton associada à transição de uma molécula de um estado eletrônico excitado ao E0, sem variação da multiplicidade.
Fosforescência	Transição do estado excitado tripleto para E0 singleto, com variação da multiplicidade.
Relaxação vibracional	As colisões entre moléculas das espécies excitadas e do solvente levam a uma transferência de energia, com aumento na temperatura do solvente. A relaxação vibracional é tão eficiente que o tempo de vida médio de uma molécula excitada vibracionalmente é de 10^{-12} , enquanto que a excitada eletronicamente é de 10^{-8} . Devido a esse fenômeno, a fluorescência sempre envolve uma transição do nível vibracional mais baixo de um estado excitado, deslocando a banda de emissão para λ maiores (Deslocamento de Stokes).
Conversão interna	Ocorre quando uma molécula passa para um estado eletrônico de energia mais baixa sem emissão de radiação. Diz respeito à transição entre dois estados de mesma multiplicidade (singleto-singleto). Assim, o que geralmente ocorre são processos de relaxação vibracional e conversão interna até o nível E1 para, finalmente, ocorrer a fluorescência, independente do λ de excitação ter excitado a molécula até E2 ou E1.
Cruzamento intersistemas	Conversão entre estados de diferentes multiplicidades (singleto-triplete). Essa probabilidade aumenta se os níveis vibracionais dos dois estados se sobrepõem. Ocorre em moléculas que contêm átomos pesados, como iodo ou bromo, e na presença de espécies paramagnéticas, como o oxigênio molecular em solução.
Conversão externa	Desativação de um estado excitado devido às interações e à transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos.

Fonte: adaptado de Holler, Skoog e Crouch (2009).

Relembrando o princípio de exclusão de Pauli, não mais que dois elétrons podem ocupar um orbital, e os dois devem ter

estados de *spin* opostos. Quando isso ocorre, se diz que os *spins* estão emparelhados, sendo denominados diamagnéticos (sem campo elétrico resultante), como ocorre no estado E0 e no E1 singlete. No caso de radicais livres (elétrons desemparelhados), eles são chamados paramagnéticos, já que são atraídos por um campo magnético, como ocorre no estado tripleto (Figura 3.9).

Figura 3.9 | Estados eletrônicos dos spins das moléculas



Fonte: elaborada pelo autor.

As propriedades de uma molécula no estado excitado tripleto e singlete são muito diferentes. Na transição singlete-triplete (ou contrário), ocorre alteração no *spin*, por isso é muito menos provável de ocorrer; além disso, o tempo de vida de um estado tripleto pode chegar a alguns segundos, e as bandas de absorção são pouco intensas. Já as transições singlete-singlete são muito mais frequentes, o tempo de vida do estado excitado é de 10^{-8} e as bandas de absorção são bem intensas.



Assimile

Estados excitados singlete e tripleto são responsáveis pela produção dos fenômenos de fluorescência e fosforescência, respectivamente.

Vários fatores influenciam na ocorrência ou não da luminescência de uma substância, bem como na intensidade do fenômeno. Dentre os mais importantes, temos:

- Estrutura química: fluorescência mais intensa é encontrada em compostos com grupos aromáticos funcionais, com transições de baixa energia. Compostos com ligações duplas altamente

conjugadas e alifáticos também podem apresentar fluorescência, mas menos intensa. Compostos heterocíclicos simples, como furanos e piridinas, não fluorescem, mas estruturas com anéis condensados, como a quinolina, fluorescem. Substituições no anel benzênico causam deslocamentos nos λ de absorção e, conseqüentemente, de emissão. A substituição por halogênios é notável, ocorrendo um decréscimo na fluorescência devido ao efeito do átomo pesado, que aumenta a probabilidade de cruzamento intersistema para o estado tripleto.

- Rigidez estrutural: a fluorescência é favorecida em moléculas com estruturas rígidas. A falta de rigidez causa aumento na velocidade de conversão interna e um conseqüente aumento da desativação não-radioativa. Parte da molécula pode sofrer vibrações, causando perda de energia.

- Rendimento quântico: razão entre o número de moléculas que fluorescem pelo número de moléculas totais excitadas. Assim, o rendimento é determinado pelas constantes (k) das velocidades de cada processo de desativação que ocorre (fluorescência, cruzamento intersistema, conversão externa, interna etc.).

- Tipos de transição: a absorção de λ menores que 250 nm é suficientemente energética para causar a desativação dos estados excitados por pré-dissociação ou dissociação (ruptura das ligações), sendo que dificilmente ocorrerá a fluorescência. No caso da fluorescência, as mais comuns são as transições do tipo $\pi^*-\pi$ (orbital π antiligante – orbital π ligante); já na fosforescência, as transições $\pi^*\eta$ (orbital π i antiligante – orbital não-ligante).

- Temperatura e solvente: a eficiência quântica da fluorescência diminui com o aumento da T devido às colisões que são favorecidas, causando desativação por conversão externa. A diminuição na viscosidade causa o mesmo efeito. Solventes contendo átomos pesados também diminuem a fluo, como tetrabrometo de carbono.

- pH: o λ e a intensidade de emissão são diferentes para formas protonadas e desprotonadas, já que as ressonâncias serão diferentes em ambos os casos. A fluorescência tem sido usada para detectar ponto final em titulações ácido-base de certos compostos que fluorescem em uma das formas.

- Concentração: geralmente, um gráfico de potência radiante

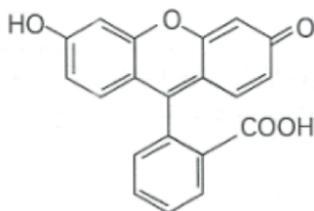
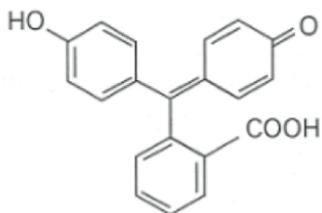
em função da concentração c é linear. No entanto, quanto maior a concentração, pode ocorrer perda de linearidade devido à absorção primária e secundária (λ de emissão sobrepõe o de excitação, sendo reabsorvido e diminuindo a fluorescência).

- Supressão dinâmica: energia não-radioativa transferida da espécie excitada para outras moléculas. Necessita do contato entre espécie excitada e agente supressor. A concentração do supressor deve ser suficientemente alta para que haja alta probabilidade de colisão entre as espécies excitadas e o supressor durante o curto tempo de vida no estado excitado. O O_2 dissolvido é um supressor eficiente, por isso soluções desoxigenadas são utilizadas antes das medidas de fluorescência ou fosforescência.



Refleta

Para que uma molécula emita radiação fluorescente, algumas características são essenciais. Considerando as duas moléculas a seguir, fenolftaleína e fluoresceína, respectivamente, qual fluoresce e por qual motivo?



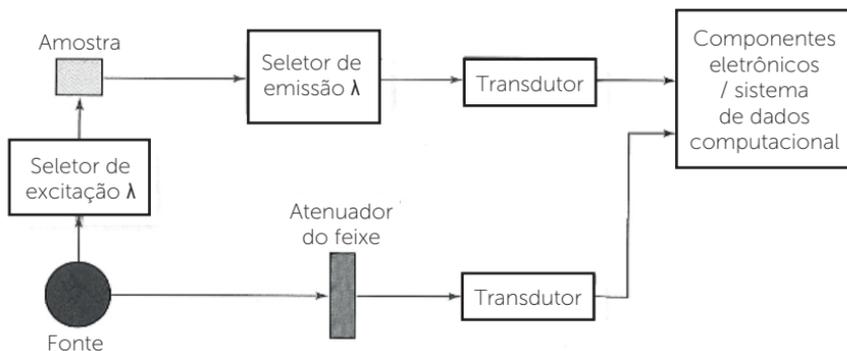
Fonte: Soares (2006).

Os equipamentos utilizados para as medidas de fluorescência são chamados fluorímetros ou espectrofluorímetros, e têm como característica importante o fato de possuírem dois dispositivos para isolamento de λ , um para o λ de excitação e outro para o λ de emissão (Figura 3.10). Basicamente, são constituídos de:

- Fonte de radiação: geralmente, são lâmpadas de xenônio que emitem na faixa de 300 a 1300 nm, porém também podem ser usadas lâmpadas de hidrogênio, mercúrio ou deutério. A radiação é dividida em dois feixes, um que passa pela amostra e outro pela referência.

- Seletor de λ de excitação: podem ser usados filtros para fluorímetros ou monocromadores para os espectrofluorímetros.
- Compartimento de amostra: de modo geral, cubetas de quartzo ou sílica fundida, as quais são transparentes na região do ultravioleta.
- Seletor de λ de emissão: assim como os de excitação, são filtros ou monocromadores, mas, nesse caso, selecionam o λ a ser monitorado no processo de emissão da fluorescência.
- Detectores: devem ser muito sensíveis, já que os sinais de emissão da luminescência são de baixa intensidade. Os detectores mais comuns são do tipo fotomultiplicadores, operando no modo contagem de fótons. Dispositivos de carga acoplada (CCDs) também são usados e permitem o registro rápido dos espectros de excitação e emissão, sendo úteis para CLAE e EC.
- Registro e tratamento de dados: calculam a razão da intensidade de fluxo para a intensidade do feixe de referência. Nos espectrofluorímetros mais modernos, softwares permitem a produção de espectros corrigidos de excitação e emissão, processamento dos picos, deconvolução, gráficos tridimensionais etc.

Figura 3.10 | Componentes de um fluorímetro ou espectrofluorímetro



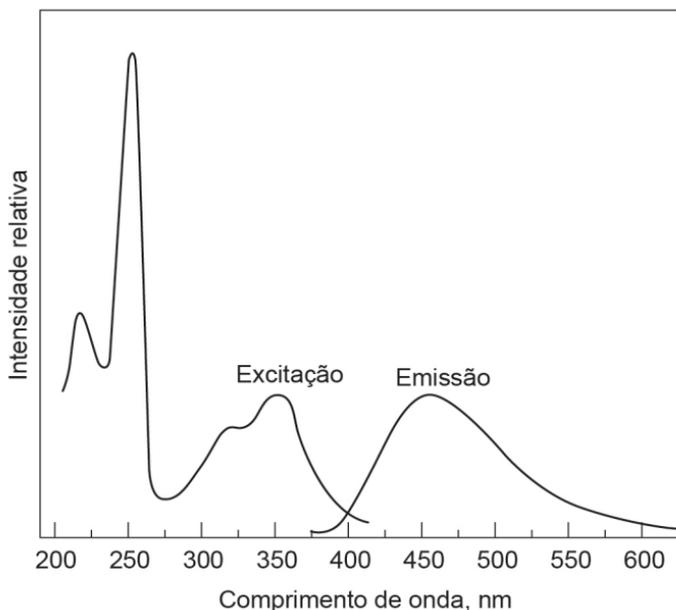
Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Dentre os modelos comerciais disponíveis, temos os fluorímetros, nos quais filtros de absorção ou interferência são usados para limitar os λ de excitação e emissão. Geralmente, são robustos e compactos. Como utilizam filtros, não permitem a obtenção de espectros, e a resposta analítica é a razão entre

as intensidades entre a amostra e a referência. Outro modelo muito utilizado, inclusive acoplado à CLAE e EC, são os espectrofluorímetros. Eles fornecem dois espectros, de excitação e de emissão, e utilizam monocromadores de rede. A radiação do monocromador é dividida, passando parte pela fotomultiplicadora de referência, parte pela amostra. A radiação fluorescente resultante da amostra, após a dispersão pelo segundo monocromador (de emissão), é detectada por uma segunda fotomultiplicadora. Os espectrofluorímetros baseados em arranjos de detectores (CCD) ainda permitem a obtenção de espectros totais de luminescência, os quais são um gráfico do espectro de emissão de cada λ de excitação apresentado de forma tridimensional (λ de excitação x λ de emissão x intensidade).

Generalizando, um espectro de excitação é obtido com λ de emissão fixo e variando λ de excitação e é, geralmente, idêntico a um de absorção sob as mesmas condições. Já os espectros de emissão de fluorescência e fosforescência envolvem excitação em um λ fixo e registro da emissão em função do λ (Figura 3.11). Existe, ainda, o espectro de luminescência total obtido nos CCDs (tridimensional), que mostram o sinal em função dos λ de excitação e emissão simultaneamente e o espectro síncrono, no qual os λ são varridos simultaneamente para excitação e emissão com uma pequena diferença no λ .

Figura 3.11 | Espectro de excitação e emissão de fluorescência para uma solução de quinino



Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Para medidas de fosforescência, existem os fosforímetros, os quais são projetos iguais aos fluorímetros, com dois componentes adicionais: um dispositivo que irradia a amostra alternadamente e, após um atraso no tempo (definido pelo usuário), mede a intensidade da fosforescência (o atraso é importante para diferenciar a emissão da fosforescência da emissão da fluorescência, já que as duas podem ser originadas da mesma amostra); e um frasco de Dewar, com janelas de quartzo contendo nitrogênio líquido, nas quais a amostra é inserida, minimizando a desativação colisional do estado tripleto.

Os métodos de fluorescência e fosforescência apresentam limites de detecção menores do que os obtidos nas medidas espectrométricas de absorção, sendo uma das técnicas mais sensíveis. Por outro lado, a precisão e a exatidão são menores, já que existem partículas na amostra que afetam a fluorescência, causando espalhamento ou supressão. Possuem faixa linear maior que os métodos espectrométricos, sendo lineares desde valores

próximos ao LOD. Também, são mais seletivos, já que não são muitas moléculas que fluorescem, além disso, pode-se variar os λ de excitação e emissão, tornando-os ainda mais seletivos.

A técnica é usada predominantemente para espécies orgânicas, mas pode ser usada para determinar espécies inorgânicas através da formação de quelatos fluorescentes ou do uso de reagentes fluorimétricos com estruturas aromáticas com grupos doadores que permitem formar quelatos com o metal. A fluorescência e a fosforescência tendem a ser complementares, uma vez que compostos que fluorescem fortemente tendem a apresentar baixa fosforescência, e vice-versa. Métodos fosforescentes são menos comuns, pois necessitam de baixas temperaturas, e a precisão observada não é boa.



Pesquise mais

O fenômeno da fluorescência constitui a base física do funcionamento das lâmpadas fluorescentes e de mecanismos, tais como o do cintiloscópio, aparelho utilizado na medição de radiações ionizantes. Para saber mais sobre o funcionamento das lâmpadas fluorescentes, acesse o link a seguir: <<http://www.mundofisico.joinville.udesc.br/index.php?idSecao=2&idSubSecao=&idTexto=8>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

A maior utilização das técnicas baseadas no fenômeno da fluorescência na área farmacêutica é como detectores de CLAE. Assim, a técnica é utilizada para o doseamento de fármacos em formulações farmacêuticas, identificação de impurezas, estudos de interações ligante-receptor e nas análises quantitativas.

Sem medo de errar

Prezado aluno, a situação-problema apresentada nos pede para tomarmos um posicionamento a favor ou contra a decisão de Maria Eduarda, ao indicar sobre o uso da espectroscopia de absorção na região do UV-Vis para determinar atenolol em amostras de sangue.

Como já vimos na seção anterior, o método é adequado para o doseamento desse composto, seja na matéria-prima, seja no produto acabado. Tanto é adequado que é um dos métodos

farmacopeicos indicados para essa análise. Agora, quando extrapolamos para a análise de atenolol no sangue, algumas particularidades devem ser consideradas, como a concentração desse composto no plasma no decorrer de um período de ensaios (decaimento plasmático) e os outros compostos presentes no sangue e que podem interferir no resultado.

Em relação à farmacocinética do atenolol, estudos relatam que, em indivíduos saudáveis, apenas 50% da dose é absorvida pelo trato gastrointestinal após a administração oral. Uma vez na corrente circulatória, o atenolol é rapidamente distribuído para os tecidos devido à sua baixa ligação às proteínas plasmáticas. Sua eliminação é predominantemente renal, sendo que a fração da dose absorvida é recuperada na urina dentro de 48 horas, apresentando meia-vida biológica de 4 a 8 horas e depuração plasmática de 1,8 a 2,2 mL/min.kg. Já em indivíduos tratados cronicamente com atenolol que sofrem de angina, o tempo de meia-vida dobra devido ao aumento do volume aparente de deposição, aumentando a depuração plasmática.

Dessa forma, concentrações baixas desse composto serão encontradas no plasma, o que sugere o uso de técnicas com bons limites de detecção e sensibilidade. Outra informação a ser considerada é que a técnica deve ser seletiva, já que, diferentemente do doseamento do ativo no medicamento, estamos falando, agora, de amostras reais, como o plasma, que contém uma infinidade de outros compostos que podem interferir na análise. Por isso, de imediato, precisamos pensar que, antes do processo de detecção, será necessária uma separação dos interferentes para então ser possível identificar e quantificar corretamente o composto. Assim, um preparo de amostras deverá ser realizado e, em seguida, a amostra deverá ser analisada por uma técnica cromatográfica, como a CLAE, que permita o isolamento do atenolol dos interferentes. Por fim, um detector adequado deve ser utilizado para quantificar o composto. Mas qual detector? Você concorda com Maria Eduarda de que o detector de UV-Vis é adequado para essa quantificação?

Depois do que estudamos nesta seção, você já deve ter argumentos suficientes para discordar de Maria Eduarda.

Analisando a estrutura química do composto (Figura 3.1),

podemos ver o anel aromático presente, o que garante que a molécula tenha alguma fluorescência. Também, discutimos nesta seção as características de seletividade da técnica, uma vez que nem todas as substâncias fluorecem quando da absorção de radiação eletromagnética. Já falamos também que a técnica de fluorescência detecta concentrações na ordem de 10 vezes menor que a absorção no UV-Vis.

Com todos esses argumentos fica muito fácil identificar a CLAE com detector de fluorescência como uma excelente técnica a ser utilizada para essa determinação.

Avançando na prática

Diagnóstico precoce do Alzheimer

Descrição da situação-problema

Para o diagnóstico da doença de Alzheimer, os médicos utilizam vários exames para verificar se os sintomas se encaixam em certos critérios e para excluir outras **causas** possíveis para esses sintomas. Até hoje não existe um exame específico para fazer o diagnóstico da doença de Alzheimer, mas seu diagnóstico precoce é importante para tratar os sintomas e retardar sua evolução.

Recentemente, cientistas desenvolveram um novo exame que faz com que as células indicadoras da doença brilhem, podendo ser captadas por um exame tão logo comecem a se formar no cérebro. A técnica é fundamentada no uso de moléculas metálicas que se ligam naturalmente a um conjunto de proteínas específicas que formam placas no cérebro dos pacientes com Alzheimer. Quando essas novas moléculas sintéticas encontram as proteínas marcadoras do Alzheimer, sua fotoluminescência aumenta em 50%, facilitando sua detecção pelos equipamentos de neuroimagem.

Até o desenvolvimento dessas moléculas metálicas, corantes chamados tioflavinas eram utilizados. No entanto, no caso das tioflavinas, elas emitem luz quase no mesmo λ da sua excitação, diferindo em 40 nm (excitação em 440 nm e emissão em 480 nm). Já as novas moléculas metálicas à base de rutênio diferem em 180 nm.

Segundo seus conhecimentos, qual é a justificativa para dizer que essa nova técnica é melhor do que a tradicionalmente utilizada?

(Fonte: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=moleculas-fluorescentes-primeiros-sinais-alzheimer&id=6720>>. Acesso em: 9 jun. 2017.)

Resolução da situação-problema

O grande problema do uso dos corantes à base de tioflavinas é que o λ de excitação e de emissão difere em 40 nm somente. Esse fato faz com que a luz original se confunda com a luz emitida, gerando imagens de baixa resolução nos equipamentos de neuroimagem.

No entanto, quando as moléculas à base de rutênio são utilizadas, a diferença entre o λ de excitação e de emissão da fluorescência é de 180 nm, ou seja, existe uma janela de separação muito maior entre os dois fenômenos, permitindo imagens mais nítidas e com resolução superior.

Faça valer a pena

1. A fluorescência, assim como a fosforescência, são casos distintos de um fenômeno conhecido como _____. A diferença entre esses dois fenômenos é que na fluorescência o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia é _____, enquanto que na fosforescência esse intervalo é _____. Esse retardo de tempo de emissão observado na _____ ocorre porque a molécula entrou em um estado de energia chamado de estado excitado _____.

Assinale a alternativa que indique o correto preenchimento das lacunas.

- a) Fotoluminescência, longo, curto, fluorescência, singleto.
- b) Fotoluminescência, longo, curto, fluorescência, tripleto.
- c) Fotoluminescência, curto, longo, fosforescência, tripleto.
- d) Quimioluminescência, curto, longo, fosforescência, singleto.
- e) Quimioluminescência, curto, longo, fluorescência, tripleto.

2. Vários fatores influenciam na ocorrência ou não da luminescência de uma substância, bem como na intensidade do fenômeno, o que, por um lado, torna a técnica bastante seletiva e, por outro lado, exige muitos cuidados durante o preparo da amostra e análise.

Em relação aos fatores que influenciam no fenômeno, marque (V) para verdadeiro ou (F) para falso.

[] Fluorescência mais intensa é encontrada em compostos heterocíclicos simples, como as piridinas.

[] Fluorescência mais intensa é observada em moléculas com estruturas rígidas.

[] O aumento da temperatura do sistema aumenta a fluorescência das moléculas.

[] O oxigênio dissolvido pode ser utilizado para aumentar a eficiência da fluorescência.

Assinale a alternativa que contem a sequência correta.

a) V - V - F - F.

b) V - F - F - V.

c) F - F - V - V.

d) F - V - V - F.

e) F - V - F - F.

3. Os fenômenos de fluorescência e fosforescência possuem grande finalidade analítica, pois a relação linear existente entre a concentração do luminóforo e a intensidade de radiação emitida permitem a identificação e determinação quantitativa de compostos de interesse.

Considerando o contexto apresentado, avalie as seguintes asserções e a relação proposta entre elas.

I. O elétron excitado retorna ao estado fundamental através da transferência de energia para uma molécula adjacente, causando a fluorescência.

PORQUE

II. Algumas moléculas, chamadas fluorescentes ou fosforescentes, quando expostas à radiação eletromagnética, têm seus elétrons excitados para níveis energéticos mais elevados.

A respeito dessas asserções, assinale a alternativa correta:

a) As asserções I e II são proposições verdadeiras, e a II é uma justificativa da I.

b) As asserções I e II são proposições verdadeiras, mas a II não é uma justificativa da I.

c) A asserção I é uma proposição verdadeira, e a II é uma proposição falsa.

d) A asserção I é uma proposição falsa, e a II é uma proposição verdadeira.

e) As asserções I e II são proposições falsas.

Seção 3.3

Espectroscopia de absorção e emissão atômica

Diálogo aberto

Prezados alunos, já conhecemos a história hipotética de Maria Eduarda e os desafios que ela tem enfrentado desde que foi aprovada em um programa de estágio de uma grande indústria farmacêutica.

Seu próximo desafio é propor um método para a avaliação das impurezas metálicas possivelmente presentes na nova matéria-prima adquirida pela empresa.

Ela sabia que, nesse caso, o objetivo era a análise de metais no seu estado isolado, ou seja, atômico, e não molecular. Assim, teoricamente, as técnicas propostas até então não poderiam ser utilizadas, pois eram técnicas de espectroscopia molecular. Será que estamos pensando corretamente?

Dessa forma, chegamos à situação-problema desta seção: considerando as características da análise de metais, o fato de que eles, possivelmente, estejam em baixas concentrações na matéria-prima e, ainda, que Maria Eduarda não sabe quais metais poderiam estar presentes, qual é a técnica que você sugeriria para ser utilizada neste caso?

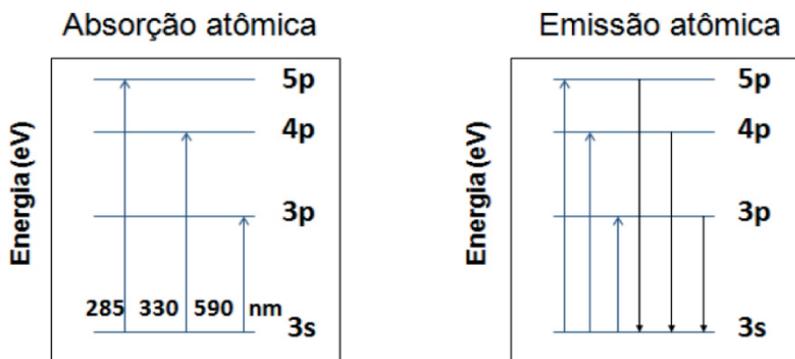
Estão prontos para mais essa etapa? Vamos começar!

Não pode faltar

A presença de metais em produtos farmacêuticos pode ter grande impacto na estabilidade do produto, bem como na sua inocuidade. Assim, a determinação de impurezas metálicas em níveis de traços é essencial para garantir a qualidade desses produtos. Dentre as principais técnicas utilizadas para essa análise, destacam-se a fotometria de chama, a espectrometria de absorção atômica (AAS) e a espectrometria de emissão atômica (AES). Todas essas técnicas obedecem à Lei de Beer e baseiam-se na absorção ou emissão de radiação visível ou ultravioleta por

parte dos elétrons que, ao sofrerem um salto quântico depois de devidamente excitados, devolvem a energia recebida para o meio, voltando para a sua camada orbital de origem (Figura 3.12). A fotometria de chama, apesar da sua simplicidade e baixo custo, tem sido suplantada pelas demais técnicas, já que é restrita aos metais alcalinos e não alcança os limites de quantificação obtidos nas demais. Já a fluorescência atômica, apesar de muito útil para determinação quantitativa de vários elementos, tem poucas vantagens em relação às técnicas já consagradas de absorção e emissão atômica, além de os equipamentos serem mais caros. Por isso, não trataremos dessas duas técnicas, mas as demais veremos no decorrer desta seção, iniciando pela absorção atômica.

Figura 3.12 | Diagrama simplificado do processo de absorção e emissão atômica



Fonte: elaborada pelo autor.



Assimile

As técnicas de espectrometria atômica são fundamentadas na interação entre a radiação e os átomos no estado livre. Por isso, o elemento a ser determinado deve ser, primeiramente, atomizado, ou seja, deve estar em um estado neutro e isolado. A partir disso, três fenômenos podem ocorrer:

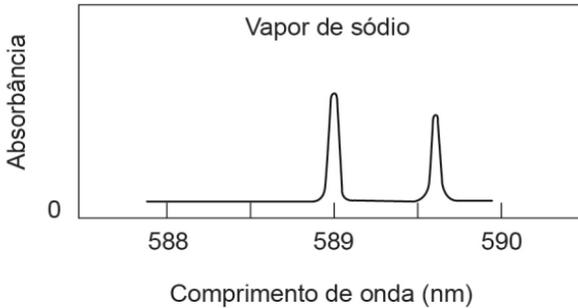
Fenômeno	Excitação	Desativação
Absorção atômica	Absorção de um fóton	Qualquer
Emissão atômica	Qualquer	Emissão de um fóton
Fluorescência atômica	Absorção de um fóton	Emissão de um fóton

Fonte: elaborada pelo autor.

Relembrando alguns conceitos importantes, quando a radiação passa por um sólido, líquido ou gás, certas frequências podem ser absorvidas, um processo pelo qual a energia eletromagnética é transferida para os átomos que compõem a amostra. A absorção promove essas partículas do seu estado fundamental para um ou mais estados excitados. Conforme a teoria quântica, os átomos apresentam somente um número limitado de níveis de energia discretos. Para que a absorção ocorra, a energia do fóton de excitação deve ser exatamente igual à diferença entre os estados fundamental e excitado, sendo essas diferenças únicas para cada espécie.

Assim, quando a radiação passa por um meio constituído de partículas monoatômicas (por exemplo, uma dispersão gasosa de átomos de sódio), poucas frequências bem definidas são absorvidas, gerando picos estreitos, e esse fenômeno é conhecido como absorção atômica (Figura 3.13). O processo mais utilizado é introduzir a amostra na forma de um aerossol em uma chama apropriada. A energia térmica da chama provoca a atomização da amostra. Nas condições de uma chama, a população de uma espécie atômica se mantém no E0 e apenas uma pequena fração dos átomos sofre excitação. No caso de átomos de sódio dispersos em uma chama, eles podem absorver λ que provoquem transições do 3s para estados energéticos, como 3p e 4p, sendo o espectro de absorção composto dessas raias de ressonância.

Figura 3.13 | Espectro de absorção atômica característico de um vapor de sódio



Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Linhas estreitas são altamente desejáveis, tanto para espectros de absorção como de emissão, porque reduzem a interferência devido à sobreposição com outras linhas. No entanto, como pode ser observado na Figura 3.13, as linhas, geralmente, são na forma de uma banda simétrica de λ em torno do λ médio. Isso ocorre devido aos fenômenos de alargamento da linha:

- Alargamento por incerteza: as linhas espectrais têm larguras finitas porque os tempos de vida dos estados de transição são finitos, o que leva à incerteza nos tempos de transição e ao alargamento de linha como consequência.

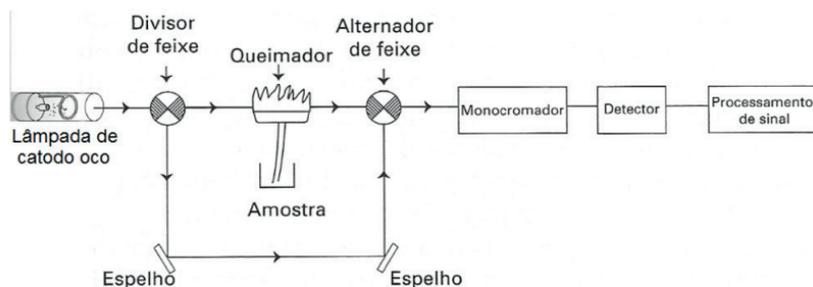
- Efeito Doppler: o λ da radiação absorvida (ou emitida) por um átomo que se move rapidamente diminui se o movimento for em direção ao detector (detector vê a crista mais frequentemente) e aumenta se o átomo se afasta dele (detector enxerga a crista menos frequentemente). Em uma chama, o movimento atômico é desordenado e sua velocidade é proporcional à temperatura, sendo que esse fenômeno praticamente dobra a largura das linhas espectrais.

- Alargamento por pressão: ocorre devido à colisão da espécie emissora ou absorvedora com outras espécies presentes, produzindo variações nos níveis de energia. Essas colisões produzem alargamento de até três ordens de grandeza das linhas originais.

- Efeito Zeeman: quando um vapor atômico é exposto a um forte campo magnético, ocorre desdobramento dos níveis de energia eletrônicos dos átomos, levando à formação de diversas linhas de absorção para cada transição eletrônica.

A instrumentação para medidas de absorção atômica consiste, basicamente, de uma fonte de radiação, um suporte para amostra, um atomizador, um seletor de λ , um detector e um processador de sinal (Figura 3.14). A seguir, veremos em detalhes cada componente:

Figura 3.14 | Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica com atomização em chama e feixe duplo



Fonte: Soares (2006).

- Fonte de radiação: na AAS, utilizam-se fontes de radiação individuais para cada elemento que emitem o mesmo λ do analito que se deseja medir. Isso porque as linhas de absorção atômica são muito estreitas, então a fonte emite o λ (linha estreita), a amostra absorve o λ (banda de absorção) e a diferença (espectro após a passagem pelo monocromador) é medida. Os principais tipos de lâmpada são as de catodo oco, construídas com o metal cujo espectro se deseja medir, e as de descarga, sem eletrodos que fornecem intensidades radiantes de uma a duas ordens de magnitude maiores que as de catodo oco, no entanto não são tão confiáveis e existem para poucos elementos.

- Introdução da amostra: é a etapa mais crítica na espectroscopia atômica. A função desses sistemas é garantir uma quantidade reprodutível e representativa da amostra para os atomizadores. No caso de amostras líquidas, o método mais comum é a nebulização direta, a qual consiste de um nebulizador que introduz continuamente a amostra na forma de aerossol até uma chama. Os nebulizadores mais comuns para a chama são os pneumáticos. Já para a introdução de amostras sólidas, a técnica mais comum é uso de uma barra de grafite contendo a amostra, que é aquecida

por condução. A amostra vaporizada é levada ao atomizador por um fluxo de gás inerte. Outras técnicas de introdução são a introdução direta, ablação por arco ou centelha, ablação por laser e descarga luminosa.



Exemplificando

A etapa de preparo das amostras também é importante nas análises por AAS, principalmente, quando tratamos de amostras complexas, como alimentos. Nesses casos, a amostra precisa sofrer um processo de mineralização, também chamado de abertura, antes da análise:

- Mineralização via seca: é realizada em muflas, com destruição da matéria orgânica, restando cinzas. Utilizada para elementos metálicos não sujeitos à volatilização às temperaturas da mufla.
- Mineralização via úmida: pode ser realizada em sistemas abertos, como tubos Kjeldahl, ou fechados. Utilizada para elementos que se volatilizariam na temperatura da mufla, como Hg, Pb, Se, As e Cd.

- Atomizador: dentre os vários tipos de atomizadores, os mais comuns são os atomizadores por chama, atomização eletrotérmica, geração de hidretos e vapor frio.

Na atomização por chama, uma solução da amostra é nebulizada por um oxidante gasoso e um combustível e levada à chama, na qual ocorre a atomização. A atomização consiste na dessolvatação (retirada do solvente) e produção de um aerossol de moléculas no estado sólido. Esse aerossol é volatilizado para formar moléculas gasosas que são dissociadas. Diferentes combustíveis (acetileno, hidrogênio) e oxidantes (ar, óxido nítrico) produzem chamas de diferentes temperaturas e velocidades de queima. O importante é garantir que a chama fique estável no decorrer da análise. Dentre todas as técnicas de atomização, a de chama é a mais reprodutível, porém outros métodos são mais sensíveis. Além disso, a chama exige amostras na forma de solução.

A atomização eletrotérmica (também conhecida como forno de grafite) é a mais sensível, já que toda a amostra é atomizada em um curto período de tempo. O processo inicia quando alguns microlitros da amostra são evaporados em baixa temperatura e queimados a

uma temperatura superior nos tubos de grafite. Após a queima, a temperatura aumenta rapidamente, promovendo a atomização da amostra em poucos milissegundos. A absorção do vapor atômico é, então, medida. Geralmente, a amostra é depositada sobre a plataforma de L'vov (dentro do tubo), e isso permite que a temperatura não varie tão bruscamente, aumentando a reprodutibilidade. A técnica é usada tanto para amostras líquidas como sólidas.

A atomização de hidretos é útil para análise de arsênio, antimônio, estanho, bismuto, selênio e chumbo. Esses elementos são convertidos em hidretos voláteis, os quais são transportados para a câmara de atomização por um gás inerte. Por fim, existe também a atomização por vapor frio, a qual é usada para determinação de mercúrio, já que é o único elemento metálico com pressão de vapor apreciável à temperatura ambiente. O mercúrio é convertido a Hg^{2+} pelo tratamento das amostras com oxidante, seguido de uma redução do Hg^{2+} a Hg^0 , que é atomizado.

- Espectrofotômetros (seletor de λ): em geral, devem ser capazes de fornecer uma largura de banda estreita que isole a linha selecionada. Existem os equipados com filtros intercambiáveis de vidro ou com monocromadores de UV-Vis. Os de feixe único constituem-se de uma fenda de entrada, uma lente ou um espelho que produz um feixe paralelo, uma rede de reflexão, uma lente ou um espelho que focaliza novamente a imagem e uma fenda de saída. O ajuste do 100% de T é feito enquanto um branco é aspirado para a chama ou sofre ignição. A T da amostra é obtida substituindo o branco pela amostra. Nos de feixe duplo, dois feixes são formados no espaço por um modulador de feixes (Figura 3.14). Um passa pela chama com a amostra e outro a contorna. A razão entre os sinais é amplificada e levada ao dispositivo de saída. Como o feixe de referência não passa pela chama, não corrige a potência radiante ou espalhamento da chama.

- Detectores: na AAS, geralmente, utilizam-se transdutores do tipo tubo fotomultiplicador.

Infelizmente, algumas interferências nas medidas ocorrem, principalmente, na técnica de atomização por chama. Uma delas é a interferência espectral, que ocorre quando a fonte de absorção ou o espalhamento se origina da matriz da amostra. Nesse caso, a potência transmitida pela amostra é reduzida, mas a incidente

e a que passa pela referência não. Assim, um erro é produzido na medida de absorvância e no cálculo da concentração final da espécie. Outro problema frequente é devido ao uso de solventes orgânicos na dissolução da amostra, ou quando espécies orgânicas estão presentes na amostra. Essa matéria orgânica deixa partículas de carbono que espalham a luz. As interferências espectrais da amostra também eram um grande problema para a técnica do forno de grafite, mas com o uso da plataforma de L'vov e da correção de fundo baseada no efeito Zeeman as interferências diminuíram muito. Dentre os métodos de correção espectral, temos a correção de duas linhas (utiliza uma linha da fonte como referência, proveniente de uma impureza, próxima à linha do analito), a correção com fonte contínua (a lâmpada de deutério fornece radiação na região do UV, que é subtraída daquela do feixe do analito) e a correção de fundo baseada no efeito Zeeman (fornece uma correção de fundo muito mais exata e é muito útil para atomizadores eletrotérmicos, permitindo a determinação direta de elementos em amostras, como sangue e urina).

Além das interferências espectrais, vale a pena citar as interferências químicas, já que são mais comuns do que as primeiras e seu efeito pode ser minimizado através da otimização da metodologia. O tipo mais comum de interferência química ocorre devido à formação de compostos de baixa volatilidade, que reduzem a atomização do analito. Para solucionar o problema, podem ser utilizados agentes de liberação (cátions que reagem com o ânion, liberando o analito) ou de proteção, tipo EDTA (formam espécies voláteis e estáveis com o analito).

Como já comentamos, a AAS segue a Lei de Beer, no entanto, muitas vezes, se observa, experimentalmente, curvas não lineares, além do que são inúmeras as variáveis não controladas no processo de atomização. Por isso, deve-se sempre calibrar o equipamento no dia da análise. O uso do método de adição padrão é uma forma muito utilizada para compensar as interferências espectrais e químicas. A absorção atômica determina, aproximadamente, 75 elementos minerais. Em relação aos limites de detecção, a chama fornece limites de detecção (LODs) em torno de 0,001 ppm, enquanto que no forno pode chegar a 10^{-5} ppm. Quanto à exatidão, na chama é possível chegar a 1 ou 2%, e no forno, a exatidão é em torno de 5 a 10%.



Pesquise mais

Conheça, no link disponibilizado a seguir, os modernos equipamentos AAS com atomização em chama e AAS com atomização em forno de grafite com correção do efeito Zeeman.

Disponível em: <<http://www.directindustry.com/pt/prod/agilent-technologies-life-sciences-and-chemical/product-32598-1341831.html>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

Agora, vamos falar sobre a técnica de espectroscopia de emissão atômica (AES). A espectroscopia de emissão se baseia na propriedade dos átomos neutros ou íons monoatômicos em estado gasoso de emitir, quando térmica ou eletricamente excitados, radiações com λ característicos nas regiões do UV-Vis. O conjunto de radiações emitidas por uma espécie constitui o seu espectro de emissão.

Para isso, fontes energéticas devem ser capazes de volatilizar a amostra e converter o analito de interesse em átomos ou íons monoatômicos isolados e, em seguida, suprir energia suficiente para promover a excitação eletrônica das espécies atômicas ou iônicas.



Refleta

Tanto nos métodos de absorção como de emissão atômica, a temperatura tem um grande efeito na razão entre o número de partículas excitadas ou não. Entretanto, os métodos de emissão são os mais sensíveis à temperatura, por isso se utilizam temperaturas tão altas quanto 10000K. Considerando as particularidades das duas técnicas, reflita: por que o efeito da temperatura é maior nas técnicas de emissão atômica?

Os espectros de emissão são chamados de espectro de raias e ocorrem quando a espécie atômica ou iônica excitada retorna ao E0 emitindo λ característico. Existem também os espectros de bandas, emitidos por moléculas, cujos átomos isolados foram excitados, no entanto algumas moléculas transitórias, como CN e OH, mantiveram-se íntegras, gerando um número grande de raias muito próximas,

formando bandas. As raias mais fortes correspondem à transições com o E0 como termo final, e as mais fracas correspondem às transições de E2 pra E1. Como já mencionado anteriormente, raias estreitas são altamente desejáveis, no entanto as mesmas causas de alargamentos de linhas discutidas para os espectros de absorção são válidas para os de emissão.

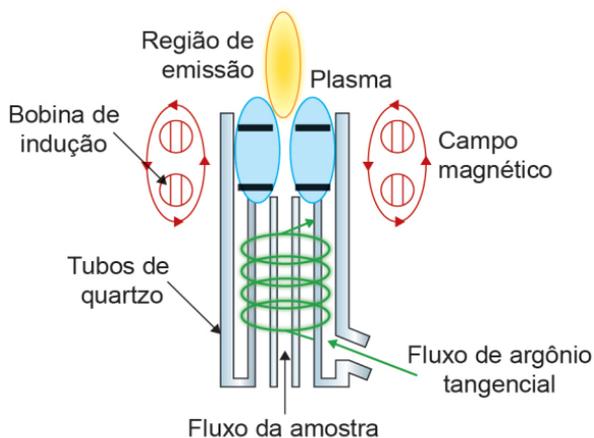
A espectrometria por emissão por plasma (ICP), arco ou centelha oferece muitas vantagens quando comparada aos métodos de absorção de chama ou forno, como menor interferência química (resultado direto das altas temperaturas) e bons espectros de emissão para muitos elementos sob as mesmas condições de excitação, permitindo obter espectros de inúmeros elementos simultaneamente. Além disso, fontes de plasma permitem a determinação de não-metais, como cloretos, brometos, iodetos e enxofre. Os espectros são bastante complexos, constituídos de centenas ou milhares de linhas, requerendo alta resolução e equipamentos ópticos caros.

Um instrumento de espectroscopia por emissão é composto de uma fonte de calor, um sistema de introdução de amostra, um espectrômetro (ICP-OES ou ICP-MS) e um processador de sinal.

- Fontes: as fontes devem ser suficientemente intensas e sensíveis, ou seja, capazes de provocar a emissão de raias de elementos presentes em nível de traços e ter intensidade proporcional à concentração do elemento emissor. É importante a constância da fonte para que o resultado seja reprodutível. Além disso, o número de átomos excitados pelo calor a um determinado nível energético aumenta exponencialmente com a temperatura. Dentre todas as fontes, a fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP, do inglês *Inductively Coupled Plasma*) é a mais utilizada.

Um plasma é uma mistura gasosa eletricamente condutora (gás ionizado) que contém uma significativa concentração de cátions e elétrons (de forma que a resultante é zero). O plasma é formado pela aplicação de um campo elétrico intenso aplicado por um gerador de radiofrequência, o qual provoca a ionização de um gás de elevada pureza, geralmente o argônio. Tais plasmas atingem 10000 K. A fonte de ICP (também chamada de tocha) consiste de tubos de quartzo concêntrico, nos quais flui o argônio a uma vazão determinada (Figura 3.15).

Figura 3.15 | Esquema de uma fonte de plasma indutivamente acoplada



Fonte: <<https://goo.gl/cc1gqd>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

As amostras são introduzidas com uma vazão de argônio, na forma de aerossol, ou pó fino formado em um nebulizador. As partículas da amostra ascendem por um canal axial estreito, com temperatura em torno de 7000K. A elevada temperatura e o tempo relativamente longo de interação das partículas do plasma garantem a completa vaporização do soluto e o alto grau de atomização. Os átomos livres fluem em uma corrente ascendente por um canal cilíndrico e, então, são observados. Observações espectrais, geralmente, são feitas a 6000 K (onde não aparecem as linhas do argônio). A tocha pode ser visualizada axialmente (de cima) ou radialmente (corte). O tempo e a temperatura são de 2duas a três vezes x maiores do que AAS, resultando em atomizações mais completas e com menos interferências químicas. A ionização significativa produzida pelo plasma o torna uma excelente fonte para o ICP-MS, como veremos em breve.

Fontes de arco ou centelha também podem ser utilizadas. Nesse caso, a excitação da amostra ocorre no espaço entre dois eletrodos de metal. Não são mais muito utilizados e sua principal aplicação é na análise qualitativa de amostras não metálicas, como solos, materiais de plantas, rochas e minerais. Fontes de descarga luminosa, sistemas de emissão baseados em fonte de laser e os métodos baseados na chama também são utilizados em alguns casos específicos.

- Introdução da amostra: para a introdução de amostras líquidas, os métodos mais comuns incluem a nebulização direta (já mencionada), a vaporização eletrotérmica, a CLAE e a injeção em fluxo (FIA). Dentre as técnicas mais comuns para introdução de amostras sólidas, está o uso de vaporizadores eletrotérmicos. Aqui, a amostra é aquecida por condução dentro do forno de grafite e, depois, levada ao plasma para a atomização.

- Espectrômetros de ICP-OES (emissão óptica com plasma): a maioria dos disponíveis comercialmente atua na região do UV/Vis (170 a 800nm), sendo que alguns atuam também na região do 150 a 160 nm, onde aparecem as linhas de emissão do P, S e C. Os mais comuns são os Instrumentos Sequenciais, os quais, geralmente, incorporam um monocromador de rede e são programados para mudar da linha de um para o outro a cada intervalo de segundos. A detecção pode ser do tipo espectrômetros de varredura rápida (a rede ou o detector e a fenda se movimentam mais lentamente na região do λ de interesse) ou espectrômetros de varredura Echelle (movimenta-se uma fotomultiplicadora no eixo x e y para varrer uma placa localizada no plano focal do monocromador). Existem também os Instrumentos Multicanais, que medem simultaneamente as linhas de emissão de vários elementos, por isso necessitam de maior tempo para introduzir a amostra.

Em relação às interferências, as químicas e o efeito de matriz são praticamente desprezíveis quando comparados à AAS, mas deve-se tomar cuidado em baixas concentrações do analito. Como há inúmeras linhas espectrais no ICP-OES, sempre podem ocorrer interferências espectrais. Os limites de detecção, geralmente, são menores que as demais técnicas atômicas.

- Espectrômetros de ICP-MS (espectrometria de massas por plasma): uma análise por espectrometria de massas atômicas envolve a atomização, a conversão de uma fração dos átomos formados em corrente de íons, a separação dos íons de acordo com a m/z e a contagem dos íons que chegam ao detector. Os dados, de modo geral, são apresentados como gráficos de intensidade relativa versus razão m/z . Os tipos mais comuns de MS de massa atômica são três: quadrupolo, tempo de voo e de dupla focalização. Mais de 90% dos elementos da tabela periódica podem ser analisados por ICP-MS. Como estudaremos o tópico

Espectrometria de Massas, na Unidade 4, o importante, aqui, é saber que ele pode ser utilizado como um espectrômetro da técnica de ICP.

Em relação às interferências, comparado ao OES, os espectros de MS são muito mais simples. Por exemplo, para o Cério, enquanto o OES tem milhares de linhas de emissão, todas superpostas a um espectro de fundo, no MS consistem de dois picos, um de $^{140}\text{Ce}^+$ e outro de $^{142}\text{Ce}^{++}$. No entanto, as interferências também existem e podem ser de origem espectroscópica ou não-espectroscópica. A técnica permite LODs melhores que o ICP-OES e tão baixos quanto AAS de atomização eletrotérmica.

As técnicas de espectroscopia atômica são de grande utilidade na área farmacêutica, seja na determinação de impurezas metálicas em medicamentos, como já mencionado, seja na determinação de metais pesados em alimentos, ou ainda em produtos naturais ou outras matrizes de interesse.

Sem medo de errar

A situação-problema proposta nesta seção diz respeito à escolha de um método para a determinação de impurezas metálicas possivelmente presentes na matéria-prima atenolol. Maria Eduarda refletiu corretamente quando concluiu que, como se tratava da análise de átomos no seu estado isolado, não poderia utilizar técnicas de absorção molecular, configuradas para a obtenção de espectros referentes a bandas de absorção de moléculas. Aqui, seria somente uma linha referente a um λ , já que estamos falando somente de um átomo (na verdade, sabemos que, devido aos alargamentos de linha, geralmente, temos uma banda simétrica).

E como responder à questão proposta: qual a técnica analítica a ser empregada? Vamos responder através das considerações feitas na própria situação-problema.

Já concluímos que, por se tratar de uma análise de metais, as técnicas de espectroscopia molecular não suprem essa necessidade. Assim, técnicas de espectroscopia atômica precisam ser utilizadas.

Considerando o segundo fato comentado, ou seja, que eles possivelmente estejam em baixas concentrações na matéria-

prima, devemos pensar em técnicas sensíveis e que permitam a obtenção de baixos limites de quantificação. Assim, mesmo traços de impurezas poderiam ser detectados.

Dentre as técnicas estudadas, as que apresentam maior sensibilidade e baixos limites são as técnicas de absorção atômica utilizando atomização eletrotérmica, também conhecida como forno de grafite, ou então as técnicas de emissão atômica utilizando espectrometria de massas por plasma (ICP-MS).

Mas, agora, vem uma pergunta incômoda: entre essas duas técnicas, qual é a melhor? Em termos de limites de detecção, as duas são excelentes, mas a última consideração feita na situação-problema nos dá uma pista: Maria Eduarda não sabe quais metais podem estar presentes. Como trata-se de uma matéria-prima nova, não há como saber que tipo de impurezas pode estar presente. Dependendo da rota de síntese, da estabilidade do produto, dentre outras características próprias, o tipo e a quantidade de impureza podem variar.

Por isso, um método capaz de determinar simultaneamente várias impurezas seria ideal, ao invés de desenvolver vários métodos diferentes, um para cada metal. Dessa forma, a técnica de ICP-MS é a melhor opção, já que possibilita a análise simultânea de vários metais, além de não metais, com alta sensibilidade e pouca interferência

Avançando na prática

Determinação de mercúrio em amostras de água

Descrição da situação-problema

O mercúrio é um metal que tem sido utilizado pelos seres humanos desde a época pré-histórica, e ao longo dos séculos tem sido empregado em diversos segmentos industriais, odontológicos, médicos, entre outros. Outra utilização do mercúrio é nos processos de concentração e extração de ouro em garimpos, resultando na liberação de toneladas do metal ao meio ambiente. A exposição humana aos compostos de mercúrio presentes no ambiente ocorre pela inalação do vapor de mercúrio ou pela ingestão de água e alimentos contaminados, principalmente os peixes. Os efeitos toxicológicos incluem a perda dos dentes,

tremores, espasmos musculares, alterações de personalidade, irritabilidade e nervosismo.

Os métodos analíticos para a determinação de mercúrio desempenham um importante papel no monitoramento do meio ambiente (solo, águas superficiais e profundas e sedimentos), bem como na segurança dos alimentos e da água consumidos pelas populações.

Considerando essa breve introdução e o que foi estudado nesta seção, qual metodologia você recomendaria para a determinação deste composto em amostras de água superficial proveniente de um rio localizado na região Amazônica e que, historicamente, tem sido utilizado no processo de garimpo?

Resolução da situação-problema

Em uma primeira análise da situação proposta, podemos concluir que estamos tratando da determinação de somente um composto, o mercúrio metálico, em concentrações provavelmente altas. Assim, não será necessária uma técnica para determinação de multielementos, como a ICP, mas sim um método de absorção atômica. E qual é o mais adequado?

O mercúrio é o único elemento metálico que tem uma pressão de vapor apreciável em temperatura ambiente (2×10^{-3} torr a 25 °C). Por isso, o método mais utilizado é baseado na atomização utilizando vapor frio.

Resumidamente, a amostra é decomposta em uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico, a qual converte o mercúrio ao estado Hg^{2+} ; em seguida, é reduzido a Hg^0 com cloreto de estanho. O mercúrio elementar, então, é varrido pelo tubo de atomização até a célula de medida. A determinação é realizada utilizando lâmpadas de catodo oco de mercúrio de 253,7 nm. A absorbância é diretamente proporcional à concentração de mercúrio na célula, a qual, por sua vez, é proporcional à concentração de mercúrio na amostra. Essa técnica possui vantagens, tais como: simplicidade, rápida resposta analítica, boa sensibilidade, operação à temperatura ambiente e baixo custo de operação.

Faça valer a pena

1. São utilizados três tipos de métodos para a realização de análise elementar, a espectrometria óptica, a espectrometria de massas e a espectrometria de raios X.

Na espectrometria óptica, os elementos presentes em uma amostra são convertidos em átomos gasosos ou íons elementares, em um processo chamado de _____.

A lacuna da sentença acima é corretamente completada por:

- a) Ionização.
- b) Absorção.
- c) Atomização.
- d) Emissão.
- e) Excitação.

2. A espectrometria de absorção atômica (AAS) tem sido utilizada para determinações qualitativas e quantitativas de cerca de 70 elementos diferentes em amostras biológicas, farmacêuticas, atmosféricas, entre outras. Em relação à técnica de espectrometria de absorção atômica, marque (V) para verdadeiro e (F) para falso:

[] A AAS baseia-se no princípio de que átomos livres em estado estável podem absorver a luz em determinado λ .

[] Um instrumento de AAS é constituído, basicamente, de uma fonte de radiação, um suporte para a amostra, um atomizador, um monocromador, um detector e um processador de sinais.

[] As técnicas de atomização mais utilizadas em AAS são a atomização em chama e plasma indutivamente acoplado.

[] As fontes de radiação mais utilizadas na AAS são as de cátodo oco e as de descarga sem eletrodos.

Assinale a alternativa que apresenta a sequência CORRETA:

- a) V - V - V - V.
- b) V - V - F - V.
- c) V - F - V - F.
- d) F - V - V - F.
- e) F - V - F - V.

3. Os atomizadores, além de converterem os componentes de interesse da amostra em átomos ou íons elementares, excitam uma fração dessas espécies para estados eletrônicos mais altos, que relaxam rapidamente, emitindo linhas espectrais. Esse fenômeno é a base para os instrumentos baseados na emissão atômica.

Considerando o contexto apresentado, avalie as seguintes asserções e a relação proposta entre elas.

I. Raias estreitas são altamente desejáveis na espectrometria de emissão atômica.

PORQUE

II. Linhas espectrais na região do UV-Vis são úteis para análise elementar. A respeito dessas asserções, assinale a alternativa correta.

- a) As asserções I e II são proposições verdadeiras, e a II é uma justificativa da I.
- b) As asserções I e II são proposições verdadeiras, mas a II não é uma justificativa da I.
- c) A asserção I é uma proposição verdadeira, e a II é uma proposição falsa.
- d) A asserção I é uma proposição falsa, e a II é uma proposição verdadeira.
- e) As asserções I e II são proposições falsas.

Referências

ANDERSON, Juliana Fonte Fernandes. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE para determinação quantitativa de anti-hipertensivos e estudo de interação entre componentes da formulação**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.cbc.ufms.br:8080/jspui/bitstream/123456789/2637/1/JULIANA%20FONTES%20FERNANDES%20ANDERSON.pdf>>. Acesso em: 31 maio 2017.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. v. 2, 5. ed. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em: 31 maio 2017.

CECCHI, Heloisa Mascia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

DIÁRIO DA SAÚDE. **Moléculas fluorescentes iluminam primeiros sinais de Alzheimer**. 2011. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=moleculas-fluorescentes-primeiros-sinais-alzheimer&id=6720>>. Acesso em: 9 jun. 2017.

DIRECT INDUSTRY. **Espectômetro de absorção/de alta sensibilidade/de absorção atômica/com efeito Zeeman**. Disponível em: <<http://www.directindustry.com/pt/prod/agilent-technologies-life-sciences-and-chemical/product-32598-1341831.html>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

EBAH. **Espectrometria de emissão atômica**. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABvUoAH/espectrometria-emissao-atomica>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

GIL, Eric de Souza. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511p.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução: Célio Pasquini e colaboradores. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055p.

LEITE, Fátima da Silva et al. Disposição cinética do atenolol em pacientes coronarianos submetidos a revascularização do miocárdio. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n2/a06v42n2.pdf>>. Acesso em: 9 jun. 2017.

MANUAL DO MUNDO. **Líquido fluorescente com canetinha hidrocor (experiência)**. 2011. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=NCi6LAuekNs>>. Acesso em: 9 jun. 2017.

_____. **Como fazer um tornado luminoso (experiência de Química e Física)**. 2015. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=XQQShzZXn_M>. Acesso em: 9 jun. 2017.

MUNDO FÍSICO. **Como funciona a lâmpada fluorescente**. Disponível em: <<http://www.mundofisico.joinville.udesc.br/index.php?idSecao=2&idSubSecao=8&idTexto=8>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

OKUMURA, Fabiano; CAVALHEIRO, Éder T. G.; NOBREGA, Joaquim A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500026>. Acesso em: 14 jun. 2017.

OLIVEIRA, Marcus Paiva de. Aplicações de estudos bioquímicos quantitativos em ciências biológicas e da saúde. **Revista Eletrônica de Educação da Faculdade Araguaia - REFENARA**, v. 2, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.fara.edu.br/sipe/index.php/renefara/article/view/54/44>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

SANTOS, Diego Ives de Vilasboas; GIL, Eric de Souza. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 1, 2010. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/REF/article/view/9593/6649>>. Acesso em: 9 jun. 2017.

SOARES, Lucia Valente. **Curso básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 337p.

Espectrometria de massas, espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear

Convite ao estudo

Prezado aluno,

Esta é a última unidade desta disciplina. Até agora, vimos uma série de técnicas analíticas de extrema importância na área farmacêutica.

Nesta Unidade 4, selecionamos mais três técnicas que representam o que existe de mais avançado em termos de análises instrumentais. Análises rápidas, compostos diversos, matrizes complexas e mínimo preparo de amostra são algumas das características das próximas técnicas.

Então, para iniciarmos, vamos conhecer o contexto de aprendizagem a ser discutido nesta unidade:

Em laboratórios clínicos, inúmeros métodos imunológicos e fluorimétricos tradicionais são utilizados para analisar perfis urinários de pacientes suspeitos de apresentarem desordens metabólicas, e também para o monitoramento de drogas e análises toxicológicas. Recentemente, métodos de espectrometria de massas têm sido desenvolvidos e têm encontrado crescentes aplicações nesta área. Métodos de espectrometria de massas sequenciais, por exemplo, estão se tornando padrão para análises de desordens metabólicas em bebês

recém-nascidos.

Mas será que as vantagens dessas técnicas são tão grandes assim? A relação custo e benefício é favorável a ponto de um laboratório investir nesses equipamentos?

Responderemos a estas e a outras questões responderemos juntos no decorrer das próximas seções.

Nesta Unidade 4, intitulada *Espectrometria de massas, espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear*, detalharemos os princípios dessas técnicas instrumentais, bem como os instrumentos disponíveis e de suas aplicações na área farmacêutica.

Esperamos que, no decorrer desta disciplina, você tenha aprendido, refletido e se encantado pela diversidade de técnicas utilizadas para resolver os mais diversos problemas da nossa área de atuação.

Agora falta pouco para finalizarmos. Fique firme e siga em frente!

Bons estudos!

Seção 4.1

Espectrometria de massas

Diálogo aberto

Prezado aluno,

Nesta Seção 4.1, estudaremos o que é a espectrometria de massas (EM), suas teorias e os princípios, sua importância na área farmacêutica, suas vantagens e desvantagens, os componentes básicos dos principais instrumentos, entre outros assuntos.

Para dar início a este estudo, vamos falar um pouco sobre a situação-problema que avaliaremos nesta seção: Gustavo é um dos farmacêuticos de um grande e respeitado laboratório de análises clínicas do país. Ele e outros dois profissionais do laboratório foram escolhidos pelo coordenador para conhecer alguns laboratórios de análises localizados na Europa, considerados de referência mundial para testes de triagem neonatal. Foi assim, que ele tomou conhecimento da técnica de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), a qual permite a detecção de mais de 40 doenças congênitas em uma única análise.

Gustavo voltou de sua viagem decidido a apresentar para sua coordenação o equipamento e sugerir a aquisição dele. No entanto, havia um grande entrave: o preço do equipamento, que girava em torno de 400.000 dólares.

Uma reunião com os diretores e coordenadores havia sido agendada para a próxima semana, e na pauta Gustavo deveria apresentar um relatório de sua viagem e, a partir do que viu e aprendeu, propor novas análises, métodos e procedimentos laboratoriais.

Considerando este contexto, na sua opinião, quais argumentos Gustavo poderia usar para tentar convencer a equipe a investir na aquisição desse equipamento?

Não pode faltar

Dentre todas as técnicas analíticas disponíveis, a Espectrometria de Massas (EM, ou MS, do inglês *mass spectrometry*) talvez seja a mais universal e versátil. Isso porque a técnica fornece informações sobre a composição elementar de amostras, as estruturas das moléculas orgânicas, inorgânicas e biológicas, a composição quali e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e composição de superfícies sólidas e as razões isotópicas de átomos em amostras. Na área farmacêutica, sua maior aplicação está na determinação da estrutura de um composto desconhecido (por exemplo, um novo fármaco ou uma impureza) com a ajuda de outros métodos, como a espectrometria no ultravioleta, infravermelho ou ressonância magnética nuclear; na determinação da massa molecular de um composto; na confirmação da identidade de um composto por meio da comparação com espectros de compostos conhecidos; e na quantificação de compostos com estrutura conhecida por meio da monitoração de um fragmento específico de alta abundância. A técnica é muito sensível, sendo capaz de detectar fentogramas (10^{-15} g) de um composto em uma amostra.



Exemplificando

A grande utilização da Espectrometria de Massas pode ser exemplificada considerando algumas das aplicações nas seguintes áreas:

- Biotecnologia: análise de proteínas, peptídeos e oligonucleotídeos; monitoramento de fermentação.
- Agropecuária: análise e controle de qualidade de rações, vacinas e medicamentos.
- Farmacêutica: descobertas de novas drogas e impurezas; estudos farmacocinéticos.
- Clínica: análise da hemoglobina; teste de drogas lícitas ou ilícitas.
- Ambiental: qualidade de água; contaminação em alimentos.
- Geologia: composição do petróleo; análise de solos.
- Esportes: identificação de esteroides.
- Medicina forense: investigação de crimes.

A história da EM tem início em 1897, com J. J. Thomson. A partir de então, vários pesquisadores têm recebido o Prêmio Nobel em Química e Física em decorrência de suas pesquisas sobre o tema.

Basicamente, a EM é o estudo de sistemas que causam a formação de íons gasosos (com ou sem fragmentação), caracterizada pela relação massa/carga (m/z) e abundância relativa. Em outras palavras, a técnica mede a massa de moléculas individuais que tenham sido convertidas em íons.



Assimile

Segundo o trabalho do Prof. J. B. Fenn, ganhador do Prêmio Nobel em Química no ano de 2002,

a Espectrometria de Massas é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição 'sine qua non' deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons". (LANÇAS, 2009 p. 38).



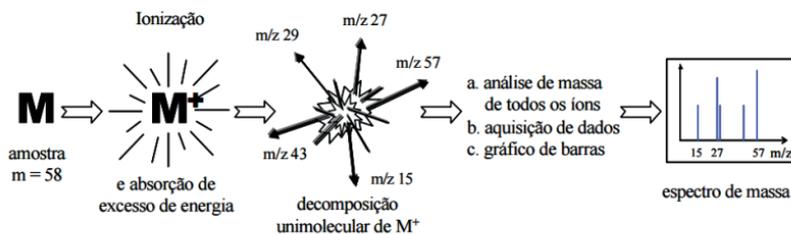
O EM é um gráfico que mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos. Note que o equipamento faz uma medida da razão massa/carga (m/z), e não da massa em si. Por isso, para darmos continuidade ao tema, algumas definições são importantes:

- Massa atômica e molecular: são expressas em unidades de massa atômica (*uma*) ou em daltons (Da). O dalton é definido em relação à massa do isótopo de carbono $^{12}_6\text{C}$, que é exatamente 12 *uma*. Assim, a *uma*, ou Da, é definida como 1/12 da massa do átomo neutro $^{12}_6\text{C}$.

- Razão massa/carga (m/z): razão, sem unidade, de seu número de massa (m) em relação ao número de carga fundamental (z) do íon. Na maioria dos casos, os íons encontrados no espectrômetro de massa possuem uma carga ($z = 1$), então, o valor m/z é numericamente igual à massa molecular iônica em unidades de massa atômica. É o que ocorre quando uma biomolécula é ionizada pela adição de um próton. Assim, uma molécula com massa de 1000 Da que seja ionizada pela adição de um próton aparecerá no espectro com m/z de 1001 [(1000+1)/1]. Por outro lado, se a mesma molécula sofrer adição de dois prótons durante a ionização, ela será detectada com m/z 501 [(1000+2)/2]. No caso menos comum de a molécula ser ionizada perdendo um próton, adquirindo carga negativa, a mesma molécula com massa de 1000 Da aparecerá no espectro com m/z de 999 [(1000-1)/1]. Por outro lado, se a mesma molécula sofrer perda de dois prótons durante a ionização, ela será detectada com m/z 499 [(1000-2)/2].

Um resumo do processo de análise pela espectrometria de massa, culminando em um espectro de massa típico, é mostrado na Figura 4.1. Nesta figura, M representa as moléculas de um composto puro na fase gasosa. Após um processo de ionização, M^+ se decompõe, criando íons de massas menores que, quando detectados, geram o espectro de massas característico.

Figura 4.1 | Esquema de uma análise por espectrometria de massas



Fonte: <<https://goo.gl/dNgRk4>>. Acesso em: 25 jun. 2017.



Assimile

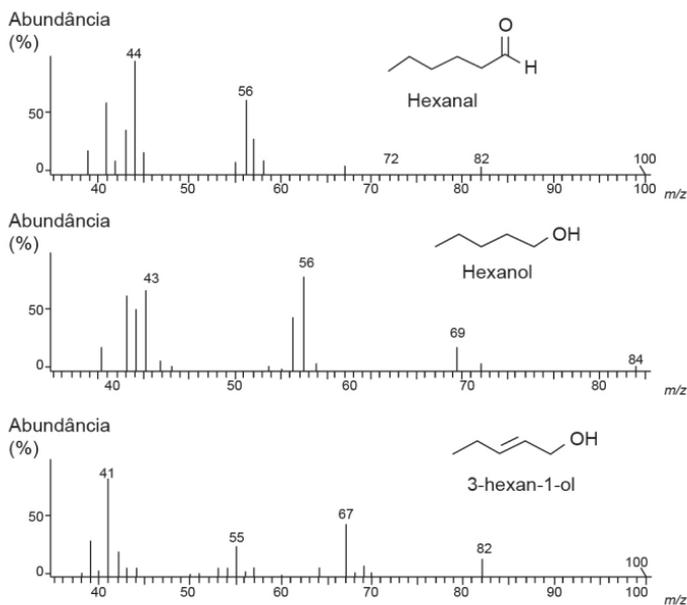
A análise por EM envolve sempre as seguintes etapas:

(1) Atomização.

- (2) Conversão de uma fração dos átomos formados em 1, em uma corrente de íons, geralmente positiva.
- (3) Fragmentação dos íons formados em 2.
- (4) Separação dos fragmentos formados em 3, de acordo com suas razões massa/carga (m/z).
- (5) Contagem do número de íons formados que incidem no transdutor.

Assim, sempre que as mesmas condições de fragmentação são empregadas, o perfil de abundância relativa obtido permanece igual para o mesmo composto. Além disso, dois compostos diferentes sempre apresentam padrões de fragmentação diferentes, mesmo quando aplicadas as mesmas condições de fragmentação (Figura 4.2). Assim, o espectro obtido é único para cada composto, o que torna a técnica muito segura para a confirmação da identidade de um composto.

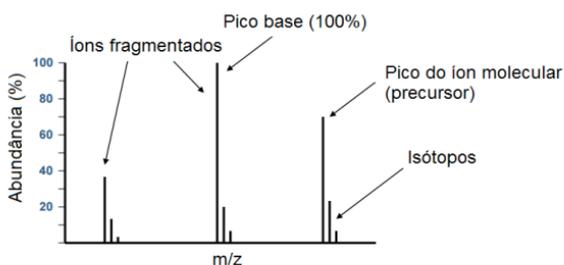
Figura 4.2 | Espectros de massas típicos obtidos por ionização eletrônica



Fonte: Soares (2006).

Em um espectro de massas, é comum vermos vários picos. De uma forma bastante resumida, é possível identificar o que os picos representam, como apresentado na Figura 4.3, na qual se identificam o íon molecular (precursor de todos os demais), o pico base (o mais intenso), os fragmentos obtidos a partir do íon molecular e os isótopos de cada íon. No entanto, como veremos mais adiante, dependendo da técnica de ionização utilizada, nem sempre será possível ver o íon molecular, bem como o número de fragmentos pode ser maior ou menor.

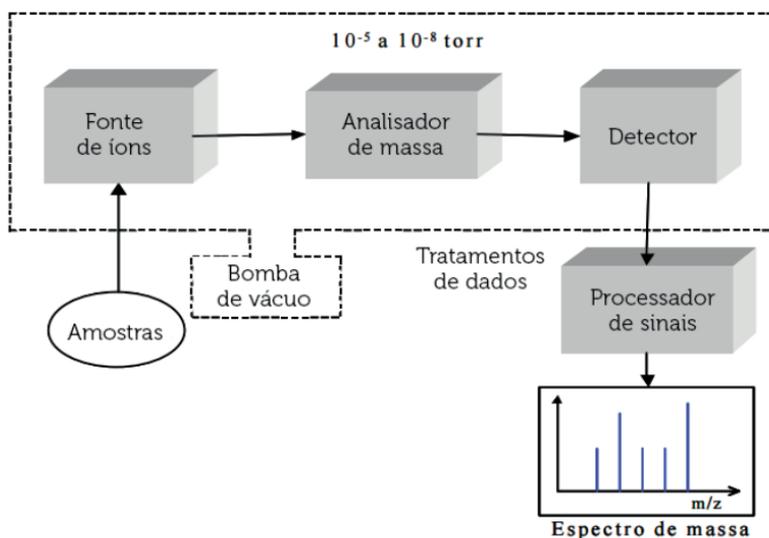
Figura 4.3 | Identificação dos picos obtidos em uma análise por espectrometria de massas



Fonte: <<https://goo.gl/xBy9ja>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

A Figura 4.4 mostra um diagrama de blocos dos componentes principais de um espectrômetro de massa. Como podemos ver, são vários os componentes, sendo três em destaque: uma fonte de íons, um analisador de massa e um detector. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons pela ação de um agente ionizante. Os íons positivos ou negativos formados são, então, acelerados em direção ao analisador de massa. A função do analisador de massa é separar tais íons de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). Os espectrômetros de massa, geralmente, são classificados de acordo com a natureza do analisador de massa, como veremos a seguir. Por fim, o detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos, os quais são processados, armazenados na memória de um computador e mostrados em uma tela, na forma de espectros. Para que o processo funcione corretamente, um sistema de alto vácuo e um sistema de introdução de amostras adequados são necessários.

Figura 4.4 | Componentes básicos de um espectrômetro de massas



Fonte: <<https://goo.gl/XfwUjT>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

Veremos, a seguir, cada componente de um espectrômetro de massas.

- Introdução da amostra: a amostra a ser introduzida na fonte de íons deve ser representativa, e o processo deve ocorrer com a mínima perda de vácuo. Além disso, deve-se levar em conta características da amostra, como sua volatilidade e termoestabilidade. A inserção direta da amostra no espectrômetro é a forma mais simples e convencional de introdução da amostra. Porém, é pouco utilizada hoje em dia. Isso porque, geralmente, se limita aos compostos com alta pureza, já que não permite a separação prévia dos compostos de interesse. O acoplamento do EM com instrumentos CLAE, CG ou EC tem sido a forma mais utilizada de inserção da amostra. Neste caso, é possível realizar a separação de misturas complexas por técnicas cromatográficas e, em seguida, a identificação desses compostos separados por EM. Conforme a ordem de eluição de cada composto da coluna cromatográfica, eles são direcionados para a fonte de ionização, na qual ocorre a fragmentação das moléculas com posterior análise, detecção, processamento e emissão do EM.

O acoplamento CG-EM é uma ferramenta analítica poderosa para a análise de misturas complexas de compostos em fase

gasosa. Isso limita a técnica à análise de compostos voláteis e semivoláteis, de baixa polaridade e baixa massa molecular. Para compostos de massa molecular maior e/ou maior polaridade e menor volatilidade, o acoplamento CLAE-EM é a técnica de preferência.

- Fontes de ionização: o início da análise espectrométrica se dá com a formação dos íons gasosos do analito. Os íons são obtidos por colisão das moléculas do composto de interesse com elétrons ou outros íons. A colisão transfere energia para as moléculas que, além de ionizar, sofrem fragmentação. Um ambiente rarefeito é essencial para que os elétrons ou íons, responsáveis pela formação dos íons do composto, sofram poucas colisões com outras moléculas estranhas presentes. Por isso a importância do vácuo no processo.

Os métodos de ionização se dividem em duas categorias principais: as fontes de fase gasosa, nas quais a amostra é vaporizada e, depois, ionizada (por exemplo, fonte de impacto de elétrons e de ionização química); e as fontes de dessorção, também chamadas de fontes brandas de ionização, nas quais a amostra no estado sólido ou líquido é convertida diretamente em íons gasosos (fonte de eletronebulização, dessorção assistida por matriz e a fonte de bombardeamento com átomos rápidos). Uma vantagem desta última é sua utilização para amostras não-voláteis e instáveis termicamente. Os equipamentos de EM mais modernos permitem a troca das fontes de acordo com a análise a ser realizada. Falaremos brevemente das fontes mais comuns.

Na fonte de impacto de elétrons (EI), a amostra é introduzida em um compartimento mantido a baixas pressões e altas temperaturas. Os compostos são bombardeados por um feixe de elétrons altamente energético (geralmente, 70 eV), que arranca um dos elétrons da molécula ao se chocar com ela, produzindo um íon positivo, conforme a reação $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$, em que M^+ é o íon molecular, o qual fragmenta, produzindo íons menores e outros fragmentos. Os espectros produzidos por EI são bastante complexos e com muitas informações (devido à extensa fragmentação), tanto que, dependendo do caso, o íon molecular não é preservado, o que dificulta a determinação da massa do composto. Já na ionização química (CI), a formação

dos íons ocorre pela reação entre os elétrons de alta energia e um gás reagente, geralmente metano, produzindo íons capazes de ionizar o composto de interesse. Pode ocorrer formação de íon positivo ou negativo, por adição ou subtração de espécies negativas ou positivas da molécula de interesse. A quebra desses íons produz fragmentos iônicos e neutros. Comparativamente ao espectro obtido por EI, aqui eles são muito mais simples, já que a fragmentação é bem menos intensa e, além disso, sempre é possível ver o íon molecular.

Considerando as técnicas de dessorção, esses métodos têm permitido a análise de espécies bioquímicas sensíveis termicamente e com massas moleculares maiores que 100.000 Da. Esses métodos dispensam a volatilização. Ao invés disso, a amostra é introduzida com formação direta dos íons gasosos. Por isso, os espectros são bem mais simples e, frequentemente, consistem do íon molecular e do íon molecular protonado. Dentre as mais comuns, temos a dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI), muito utilizada para biopolímeros e outros compostos de alta massa molecular. Nesta técnica, a amostra é dispersa em uma matriz sólida ou um solvente, a qual é depositada em uma placa metálica, que é colocada em uma câmara a vácuo. Um feixe de laser é focalizado na amostra e transfere energia para as moléculas em solução, volatilizando-as e ionizando-as, criando uma pluma de íons que serão transferidos para o analisador. Outra técnica, provavelmente a mais utilizada para interfacear com CLAE é a eletronebulização, conhecida também como *electrospray* (ESI). Ela ocorre a pressões e temperaturas atmosféricas. Uma solução da amostra atravessa um capilar até sua extremidade, a qual apresenta uma diferença de potencial de alguns kV em relação à câmara em que está inserida. Forma-se um feixe de aerossol com gotículas eletrostaticamente carregadas. O solvente é evaporado e os íons formados são conduzidos ao analisador de massas. A ESI é uma técnica de ionização bastante robusta, sendo a mais utilizada no presente, em especial para a análise de proteínas, aminoácidos e várias substâncias de interesse em bioanalítica, alimentos e farmacêutica.



Laboratórios de pesquisa na área química, farmacêutica, de alimentos, ambiental, clínica, entre outras, geralmente mantêm um ou mais espectrômetros de massas para serem utilizados nas pesquisas realizadas.

Veja, no link disponibilizado, o exemplo de um laboratório localizado na Unicamp e considerado um laboratório de referência mundial em espectrometria de massas.

Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=9J3KovAyl4A>>.
Acesso em: 26 jun. 2017.

- Analisadores de massas: a saída de qualquer fonte de ionização é um feixe de íons positivos ou negativos (geralmente, positivos) que são acelerados para os analisadores. A função destes é análoga a dos monocromadores nos espectrômetros ópticos, com a diferença de que, aqui, a dispersão se dará com base nas razões m/z . No entanto, uma diferença importante é a necessidade de um alto vácuo para que as colisões com componentes atmosféricos não interfiram na análise. Idealmente, um analisador de massas deve ser capaz de distinguir minúsculas diferenças de massa. Vale lembrar que fragmentos neutros não são detectados, já que não são afetados por um campo magnético ou outro sistema de filtração de massas. Dentre os vários tipos de analisadores disponíveis, estudaremos, a seguir, quatro dos mais empregados.

Os analisadores com setor magnético empregam um ímã permanente ou eletroímã que possibilita que o feixe da fonte de íons percorra uma trajetória circular definida. Sob efeito desse campo, o grau de deflexão de cada íon dependerá da sua massa e carga, tornando possível selecionar as razões m/z de interesse.

Os analisadores de massa do tipo quadrupolo são os mais baratos, compactos e robustos. São constituídos de quatro barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos, sendo que um par de barras é ligado ao lado positivo e o outro, ao terminal negativo. Os fragmentos são acelerados para o espaço entre as barras em direção ao detector. O campo existente entre as barras oscila continuamente, permitindo que em determinado momento somente os fragmentos com determinada razão m/z consigam

atingir o detector. À medida que o campo varia, outras razões m/z chegam ao detector. Assim, é possível realizar uma varredura dentro da faixa de m/z desejada, verificando a abundância de cada fragmento.

Outro analisador muito utilizado é o *ion trap*, também conhecido como aprisionador de íons. Consiste em um dispositivo no qual ânions ou cátions gasosos são formados e aprisionados durante longos períodos por campos elétricos e magnéticos, desenvolvendo uma órbita dentro do espaço do confinamento. Modificando as condições, os íons escolhidos são impulsionados para o detector. É possível conter na armadilha todos os íons dentro de uma faixa de m/z selecionada, ou ainda com uma m/z específica. Por isso, permitem a obtenção de baixos limites de detecção, além de serem robustos, compactos e de menor custo.

O último analisador de que trataremos nesta seção é o de tempo de voo, ou *time-of-flight* (TOF). Aqui, os íons que foram produzidos na fonte de ionização são acelerados em pulsos por diferença de potencial. Todos os íons pertencentes àquele pulso penetram simultaneamente em um tubo, no qual não há campo elétrico nem magnético, e o detector se localiza ao final deste tubo. O diferente tempo de voo até o detector se dá pela diferença de m/z dos íons, sendo a velocidade dos íons até atingirem o detector inversamente proporcional à razão m/z .

É importante citar os métodos de espectrometria de massas sequenciais, muitas vezes conhecidos como EM-EM, que permitem a obtenção de um espectro de massas de íons pré-selecionados e fragmentados. Os mais conhecidos são os do tipo triplo-quadrupolo, os quais, na verdade, são constituídos de dois quadrupolos em série com uma célula de colisão entre eles. Basicamente, no primeiro quadrupolo, ocorre a seleção do íon de interesse (íon precursor), que é enviado para a célula de colisão, na qual ocorre sua fragmentação (íon produto). O segundo quadrupolo seleciona os fragmentos de interesse.

- Detectores: da mesma forma que no óptico, um MS contém um detector que converterá o feixe de íons resultante em um sinal elétrico a ser processado, armazenado e disponibilizado ao analista de diversas formas, como em um espectro, por exemplo. O tipo mais comum é o multiplicador de elétrons, no qual os íons que

chegam ao detector ejetam elétrons que vão de uma superfície a outra de um tubo, ejetando mais elétrons a cada impacto.

- Processador de sinais: os dados são adquiridos como abundância versus tempo, e a conversão de tempo para m/z requer calibração periódica. Na maioria dos sistemas, o computador armazena todos os espectros e informações, permitindo ao usuário selecionar o tipo de informação desejada. Quando acoplados a CG, CLAE ou EC, geralmente, dois tipos de cromatogramas podem ser obtidos, um com a corrente iônica total (TIC) e outro com o monitoramento de íons selecionados (SIM).

É importante lembrar também do acoplamento ICP-MS, já visto na Seção 3.3. Neste caso, a fonte de íons normalmente é a própria tocha do ICP (plasma de argônio em alta temperatura). Uma interface leva os íons até o espectrômetro de massas, usualmente um quadrupolo.



Refleta

Dentre todas as técnicas de espectrometria de massas que vimos nesta seção, qual você recomendaria para a análise de componentes da matriz mais complexa que existe: o petróleo?

Como já foi possível perceber, a EM é uma das técnicas mais universais que existe, podendo ser utilizada para identificação e quantificação de uma infinidade de compostos orgânicos e inorgânicos, inclusive de alta complexidade.

Sem medo de errar

Depois de tudo o que Gustavo viu, ouviu e pesquisou acerca da técnica de espectrometria de massas sequencial (EM/EM), ele estava certo de que esse era o caminho a ser seguido. No entanto, só ele estava certo disso, e precisava justificar para os coordenadores e diretores do laboratório que o grande investimento financeiro inicial seria compensado brevemente.

Assim, quais são os principais pontos que poderiam ser levantados por ele para ajudar a justificar a aquisição deste equipamento?

Ele poderia iniciar explicando o que é espectrômetro de massa e há grande utilização dele nos testes de triagem neonatal na Europa. Ele também pode explicar que, após a consolidação da técnica em outras áreas, não demorou muito tempo para que ela começasse a ser aplicada na área de diagnóstico clínico, e que, em 1990, foram iniciadas as pesquisas para análise de aminoácidos, ácidos graxos e ácidos orgânicos para detecção de distúrbios relacionados ao erro inato do metabolismo em recém-nascidos, mais conhecido no Brasil como "teste do pezinho expandido". Ele pode, ainda, explicar que, apesar do alto custo inicial, as vantagens são tantas a ponto de vários sistemas de saúde ao redor do mundo estarem substituindo os métodos de imunoenaios ou de fluorimetria.

Após uma introdução, alguns aspectos comparativos poderiam ser considerados:

- Custo de manutenção: em contraste com os métodos de imunoenaios, o custo dos reagentes e acessórios do espectrômetro é bem mais baixo.

- Tempo de análise: apesar de a maioria dos métodos de imunoenaios serem rápidos, o MS/MS permite analisar rápido e simultaneamente diferentes famílias químicas, o que o torna efetivo em termos econômicos.

- Amostragem: a amostragem de sangue é realizada no pé do recém-nascido através de uma simples picada e coleta de alguns μL em papel de filtro. Após seca, a amostra é enviada ao laboratório, que realiza um procedimento simples e específico de preparo de amostra e análise por Injeção em Fluxo (FIA) ou CLAE e detecção por EM/EM por varredura, ou *screening*, das razões m/z dos compostos de interesse.

- Análise de multicomponentes: um dos grandes atrativos da técnica é a possibilidade de detectar 30, 40 ou mais doenças congênitas em uma única amostra, em uma única análise, em um único método e com um único equipamento.

- Aplicabilidade: a técnica permite a determinação de compostos termolábeis, moléculas polares e apolares e macromoléculas a partir de simples preparação de amostras complexas.

- Fácil expansão: novos compostos de novas desordens podem ser adicionados nos métodos já existentes, sem a necessidade de aquisição de novos insumos.

- Uso de softwares: os dados obtidos nos equipamentos de MS/MS são armazenados e tratados por softwares com muitas funcionalidades, como a realização automática da confirmação e de cálculos quantitativos.

- Diagnóstico precoce: devido à alta sensibilidade, a técnica possibilita o diagnóstico de muitas doenças no estado pré-sintomático. Estudos que compararam crianças diagnosticadas pela triagem neonatal com crianças diagnosticadas clinicamente demonstraram que as crianças diagnosticadas pelo *screening* neonatal iniciavam tratamento em média quatro meses antes das crianças do grupo identificado clinicamente e, quando necessitavam de internamentos, permaneciam, em média, um dia a menos no hospital a cada admissão.

- Exatidão: a triagem neonatal por MS/MS apresenta, em média, uma taxa de 0,33% de falsos positivos, o que corresponde a, aproximadamente, um caso para cada 2.400 crianças testadas. Em relação à triagem de fenilcetonúria, na técnica de MS/MS, foi encontrada uma taxa de falso-positivos cem vezes menor com o método fluorimétrico, devido à maior exatidão e precisão na mensuração da fenilalanina e à possibilidade de confirmação pela determinação da razão molar fenilalanina/tirosina.

- Sensibilidade e especificidade: a sensibilidade da técnica chega a 99%, e a especificidade, a 99,995% para a maioria das acidemias orgânicas, desordens dos aminoácidos e desordens da oxidação dos ácidos graxos.

- Uso em países desenvolvidos: a tecnologia já é amplamente usada nos testes de triagem neonatal nos Estados Unidos e na Europa.

Esses são alguns dos motivos que Gustavo pode apresentar para justificar a aquisição deste equipamento.

Contaminação de rações

Descrição da situação-problema

Durante uma análise de rotina do controle de qualidade de uma empresa de rações, uma concentração alta de vários pesticidas organoclorados foi encontrada em uma amostra de rações proveniente do Centro-Oeste brasileiro. Essa amostra foi analisada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de captura de elétrons, e o resultado obtido estava acima do permitido pela legislação brasileira. Como a empresa não possuía um CG-EM, não podia confirmar esse resultado. Por isso, enviou a amostra para um laboratório acreditado no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) nesta análise por CG-EM.

Qual é o procedimento correto a ser utilizado pelo laboratório acreditado para a confirmação da identidade desses compostos?

Resolução da situação-problema

Para qualquer análise de confirmação, é necessário um padrão puro do composto a ser determinado para permitir a comparação entre o espectro obtido da amostra suspeita e o espectro obtido de um composto que, comprovadamente, é o analito de interesse.

Esse padrão analítico de alta pureza pode ser injetado pelo analista, ou então pode ser obtido em uma biblioteca, geralmente, disponível no software do equipamento. No entanto, em ambos os casos, é importante que o método e as condições de obtenção do espectro sejam exatamente os mesmos usados para o composto que se deseja identificar.

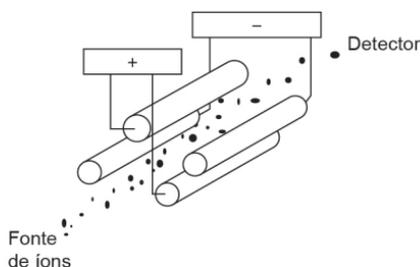
Além disso, o monitoramento de um íon somente não constitui uma confirmação. Recomenda-se a comparação da intensidade e a razão entre quatro picos característicos do padrão e do composto a ser identificado. A intensidade relativa do padrão e a do desconhecido devem ser as mesmas, com uma margem de erro de 10%, normalmente.

Por fim, se for utilizada ionização eletrônica (EI), muitos fragmentos, principalmente de m/z baixo, serão gerados, e é possível que o íon molecular não seja observado, o que pode dificultar a

diferenciação dos espectros. Na ionização química (CI), o espectro é mais pobre, o íon molecular está presente e os fragmentos apresentam m/z maiores. Essas condições facilitam a identificação e permitem a obtenção de limites de detecção mais baixos.

Faça valer a pena

1. A figura a seguir representa um tipo de analisador muito utilizado em análises por espectrometria de massas.



Fonte: Soares (2006).

O analisador de massas apresentado é um _____.

Assinale a alternativa que indique o correto preenchimento da lacuna.

- a) *Time-of-flight* (TOF).
- b) Triplo-quadrupolo.
- c) *Ion Trap*.
- d) Quadrupolo.
- e) Transformada de Fourier.

2. O espectro de massas pode ser definido como um histograma que mostra a frequência relativa de íons de acordo com sua razão massa/carga. Ainda em relação aos espectros de massas, marque (V) para as afirmações verdadeiras ou (F) para as falsas:

[] Quando analitos diferentes são analisados utilizando as mesmas condições de fragmentação, os espectros e os perfis de abundância relativa serão idênticos.

[] O espectro obtido é único para cada composto, o que torna a técnica muito segura para a confirmação da identidade de um composto.

[] Para a confirmação de identidade de um composto, um padrão de alta pureza ou uma biblioteca espectral deve ser utilizado para comparação espectral com o composto desconhecido.

[] Em um espectro de massas, sempre é possível identificar o íon molecular.

Assinale a alternativa que apresenta a sequência correta:

- a) V – V – V – F.
- b) F – V – V – F.
- c) V – F – F – F.
- d) F – F – F – V.
- e) V – V – V – V.

3. Dioxinas são contaminantes ambientais e poluentes orgânicos persistentes (POPs) que se originam como subprodutos de processos industriais, como branqueamento de papel, fabricação de pesticidas e incineração de resíduos. Esses compostos se acumulam na cadeia alimentar, principalmente no tecido adiposo dos animais, sendo que os seres humanos, geralmente, são contaminados devido à ingestão de carne, laticínios, peixes e outros produtos de origem animal. Por isso, agências regulatórias, particularmente a Comissão da União Europeia, impuseram limites rígidos para os níveis de dioxina em alimentos e rações. Em 2014, a espectrometria de massas sequencial tornou-se um método de confirmação de dioxinas aceito pelas Normas 589/2014 e 709/2014 da União Europeia.

Considerando as características dos compostos, qual é a melhor técnica de introdução da amostra e qual é a melhor fonte de ionização para esse tipo de análise:

- a) Cromatografia gasosa, ionização eletrônica.
- b) Cromatografia gasosa, MALDI.
- c) Cromatografia líquida, ICP.
- d) Cromatografia líquida, ESI.
- e) Inserção direta, MALDI.

Seção 4.2

Ressonância magnética nuclear

Diálogo aberto

Prezado aluno,

Estamos estudando, no decorrer desta Unidade 4, o que há de mais moderno e sofisticado em análises instrumentais na atualidade. Na Seção 4.1, conhecemos Gustavo e sua intenção de modernizar os métodos utilizados no laboratório de análises clínicas que ele trabalha.

Após muitas reuniões e embates entre todos os envolvidos, ele conseguiu a aprovação da diretoria da empresa para realizar a aquisição do tão sonhado LC-MS/MS.

No entanto, para dar continuidade ao projeto, o laboratório precisaria ser reformado, já que linhas de gás de pureza ultraelevada precisariam ser instaladas, assim como bombas de vácuo, válvulas sistemas de purga, além do equipamento em si. Desta forma, o laboratório de análises clínicas precisaria ser fechado por, aproximadamente, um mês.

Chegamos, então, à situação-problema que avaliaremos juntos nesta seção: a possibilidade de interdição do laboratório pelo período de um mês causou grande alvoroço na companhia, e Gustavo deveria encontrar uma solução para que as análises não parassem completamente neste período. Primeiramente, ele pensou em transferir todos os equipamentos para outra sala, mas não havia espaço, bancadas, estrutura elétrica etc. Assim, considerou a possibilidade de terceirizar as análises para outro laboratório neste período.

O laboratório RXX era um laboratório parceiro e que, muitas vezes, era acionado quando havia a necessidade de utilizar algum equipamento que o laboratório de Gustavo não tinha, e vice-versa. Por isso, ele entrou em contato com Juliana, a supervisora do laboratório, e explicou a situação. Ela foi muito atenciosa e colocou seu laboratório à disposição. No entanto, como o

laboratório RXX era um laboratório especializado em elucidação da estrutura de novos fármacos, eles não dispunham dos mesmos equipamentos que Gustavo precisava. Ela enfatizou que havia um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que não estava sendo utilizado no momento para nenhuma análise. Ela poderia disponibilizá-lo de maneira integral para a equipe do laboratório de Gustavo.

Na sua opinião, esse equipamento é a melhor opção para a realização dos testes de triagem neonatal e outros ensaios clínicos realizados no laboratório de Gustavo? Justifique sua resposta.

Não pode faltar

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica moderna, poderosa e altamente versátil para análises qualitativas e quantitativas em diversos campos de pesquisa, como medicina, farmácia, análise de alimentos, agroquímicos, cosméticos, entre outros.

A teoria básica da técnica foi proposta em 1924 por W. Pauli, quando sugeriu que certos núcleos atômicos possuíam propriedades de *spin* e momento magnético e, por isso, poderiam ser levados a um desdobramento de seus níveis de energia quando expostos a um campo magnético intenso. Em 1953, o primeiro espectrômetro de RMN de alta resolução foi projetado para estudos de estrutura química e, desde então, a técnica tem evoluído, tendo sido responsável por inúmeros desenvolvimentos da química orgânica, inorgânica e bioquímica.

Dentre as principais aplicações da RMN, podemos citar a elucidação estrutural de moléculas orgânicas; a possibilidade de conhecer os componentes individuais presentes em fórmulas de produtos; a identificação de impurezas de elementos desconhecidos em amostras complexas; a quantificação dos componentes de uma amostra; o controle de qualidade de grandes quantidades de produtos químicos, farmacêuticos, outros; a identificação de materiais; os estudos de temperatura e cinéticos em misturas de reação; e a determinação enantiômeros.



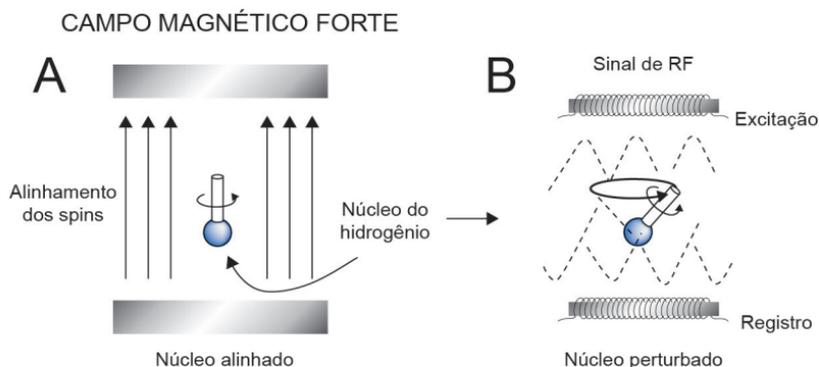
Os estudos de neurociência apresentaram um avanço gigantesco a partir da década de 1990, com a introdução da espectroscopia de RMN nos hospitais, centros de pesquisa e clínicas.

Veja no link a seguir uma explicação da técnica e sua contribuição para a área médica.

Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=3qary7nAKoE>>.
Acesso em: 29 jun. 2017.

A espectroscopia de RMN está baseada na medida de absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência (RF) entre 4 e 900 MHz. Ao contrário da absorção no UV, Visível e Infravermelho, aqui são os núcleos dos átomos, ao invés dos elétrons externos, que estão envolvidos no processo de absorção. Além disso, para que o núcleo adquira o estado de energia requerido para ocorrer absorção, é necessário colocar a amostra em um campo magnético intenso. Assim, os *spins* alinham-se (paralela ou antiparalelamente) ao campo aplicado (Figura 4.5a). Quando pulsos de RF são aplicados, os núcleos absorvem essa energia e rompem o alinhamento com o campo. Quando os pulsos são desligados, os núcleos voltam à sua posição realinhada, emitindo um sinal que será captado por uma bobina (Figura 4.5b). Ao contrário do que poderíamos imaginar, o caminho mais fácil de relaxação não é a emissão de radiação, e sim a relaxação não-radioativa. Assim, ondas de rádio de diferentes frequências são emitidas para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos.

Figura 4.5 | Movimento de alinhamento e precessão dos núcleos



Fonte: <<http://www.cerebromente.org.br/n13/tecnologia/ressonancia.htm>>. Acesso em: 29 jun. 2017.



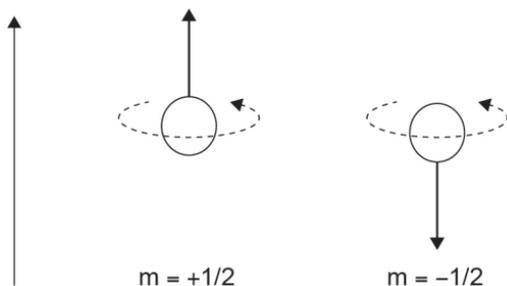
Assimile

Quando certos átomos são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, seus núcleos atuam como magnetos e seus *spins* se alinham na direção do campo aplicado. Quando pulsos curtos de RF são aplicados, ocorre uma perturbação no alinhamento dos *spins* dos núcleos, de forma que a orientação paralela ao campo magnético é perdida, causando movimentos do tipo giroscópio, denominados de precessão. Quando o pulso de RF é desligado, o núcleo tende a voltar para sua situação original, liberando energia em forma de ondas de rádio.

Quatro são os núcleos de maior interesse na área química, bioquímica e médica, que são os núcleos ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P . Isso porque o número quântico de *spin* desses núcleos é $1/2$, podendo, assim, assumir dois estados de *spin*, $+1/2$ e $-1/2$. Quando um núcleo com *spin* $1/2$ é exposto a um campo magnético externo, seu momento magnético se orienta em uma das duas direções, conforme a Figura 4.6. Vale lembrar que, como todos os compostos orgânicos contêm alguns desses átomos, a técnica pode ser considerada universal para os compostos orgânicos.

Figura 4.6 | Representação do momento magnético em uma das duas direções com relação ao campo, dependendo do seu estado quântico magnético

Campo magnético forte

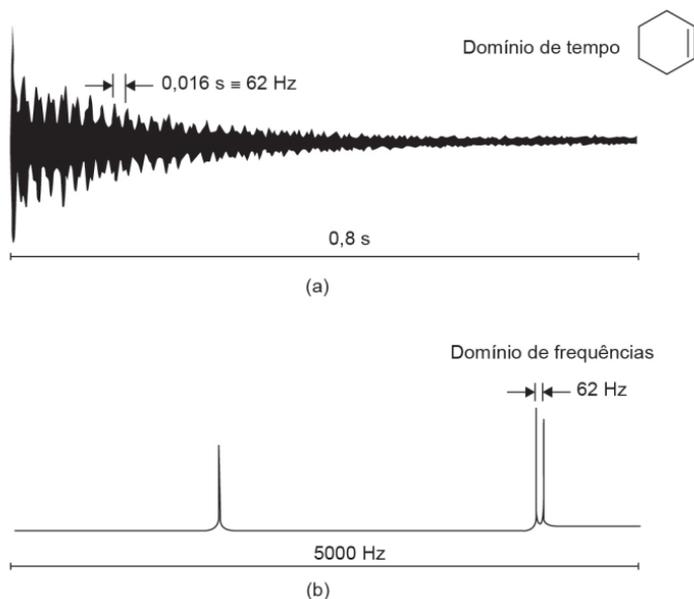


Fonte: adaptado de <<https://goo.gl/QgMu3p>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

A maioria dos equipamentos comerciais, atualmente em uso, se baseia nos princípios que vimos até aqui, ou seja, nos quais pulsos de radiofrequência desestabilizam o direcionamento do *spin*, que emitem essa energia assim que os pulsos cessam. Esses equipamentos são conhecidos como espectrômetros de RMN com transformada de Fourier (FT-RMN). Mas é importante saber que, no princípio, eram utilizados equipamentos de onda contínuos (não pulsados), em que o sinal da absorção era monitorado enquanto a frequência da fonte ou a intensidade do campo era alterada. Esses equipamentos funcionavam de forma análoga à dos de absorção óptica, vistos na Unidade 3.

Voltando ao FT-RMN, no intervalo entre os pulsos curtos de radiação de RF, um sinal de RF (chamado FID, decaimento de indução livre) é emitido pelos núcleos excitados durante a relaxação. O sinal FID pode ser detectado por uma bobina de um receptor de rádio (que pode ser a mesma bobina utilizada para irradiar a amostra com pulsos de RF). O sinal é digitalizado e armazenado para processamento dos dados. Os sinais do decaimento no domínio tempo são somados para, assim, melhorar a relação sinal/ruído e, em seguida, são convertidos pela transformada de Fourier em domínio frequência (Figura 4.7). Assim, o espectro de RMN é obtido pela transformada de Fourier deste sinal.

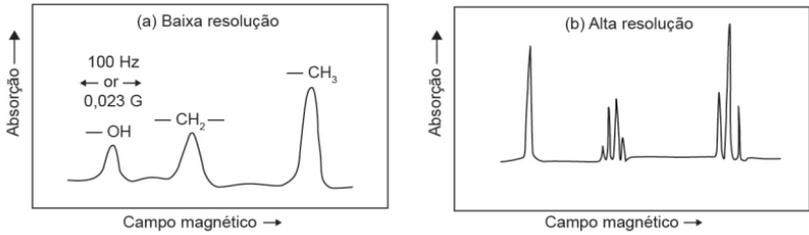
Figura 4.7 | Sinal obtido de uma análise por RMN de ^{13}C do ciclohexano. (A) sinal FID, domínio tempo e (B) sinal da transformada de Fourier (espectro), domínio-tempo e domínio-frequência.



Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

Os espectros obtidos em RMN dependem do equipamento utilizado, do tipo de núcleo, do estado físico da amostra etc. Genericamente, podem ser espectros de linhas largas ou de alta resolução. No primeiro caso, a largura da banda que origina as linhas é grande o suficiente para ocultar a estrutura fina. Uma única ressonância está associada a cada espécie. Seu uso, hoje, se restringe a determinações quantitativas de isótopos e estudos de espécies absorventes. Já os espectros de alta resolução permitem diferenciar frequências inferiores a 0,01 ppm. Tais espectros, geralmente, apresentam vários picos para cada isótopo, fornecem muito mais informações e são os mais utilizados hoje em dia (Figura 4.8).

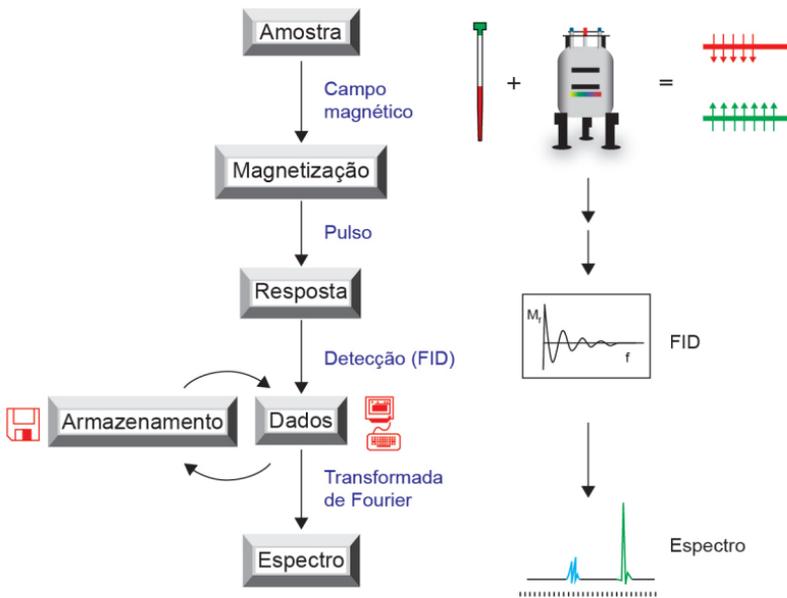
Figura 4.8 | Espectro de RMN do etanol: (A) baixa resolução e (B) alta resolução



Fonte: Adaptado de Holler, Skoog e Crouch (2009).

Na Figura 4.9, temos um diagrama de como ocorre a obtenção do espectro final de um FT-RMN.

Figura 4.9 | Diagrama do processo de aquisição de um espectro RMN



Fonte: adaptada de <<http://www.monografias.com/trabajos101/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear.shtml>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

A frequência de radiação RF absorvida por um dado núcleo é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, isto é, pelos elétrons e núcleos vizinhos. Assim, mesmo moléculas simples podem fornecer muitas informações espectrais, que permitem elucidar estruturas

desconhecidas. Dois efeitos são mais comuns o deslocamento químico e o desdobramento *spin-spin*. Na Figura 4.8b, é possível ver o desdobramento *spin-spin* observado em dois dos três picos, quando picos adicionais aparecem no espectro de RMN.

- Deslocamento químico: é causado por pequenos campos magnéticos, chamados correntes diamagnéticas, gerados por elétrons que circulam ao redor dos núcleos, e esses pequenos campos, geralmente, opõem-se ao campo aplicado. Assim, os núcleos ficam expostos a um campo efetivo normalmente menor do que o campo externo. É dito que o núcleo está blindado em relação ao efeito total do campo primário. Em decorrência disso, o campo externo precisa ser aumentado para causar a ressonância. A blindagem está diretamente relacionada à densidade eletrônica que o circunda, ou seja, na ausência de outras influências, espera-se que a blindagem seja reduzida com o aumento da eletronegatividade de grupos adjacentes.

- Desdobramento *spin-spin*: ocorre quando o momento magnético de um núcleo interage com momentos magnéticos de outros núcleos adjacentes. Neste caso, o campo elétrico criado pela rotação de um núcleo afeta a distribuição de elétrons em suas ligações com outros núcleos, afetando a ressonância. Se os *spins* são paralelos e opostos ao campo externo o campo efetivo é diminuído, devendo-se aplicar um campo maior para obter a ressonância, o que resulta em deslocamento para campo mais alto. Se os *spins* são paralelos e alinhados ao campo, resultam em deslocamento para campos mais baixos.



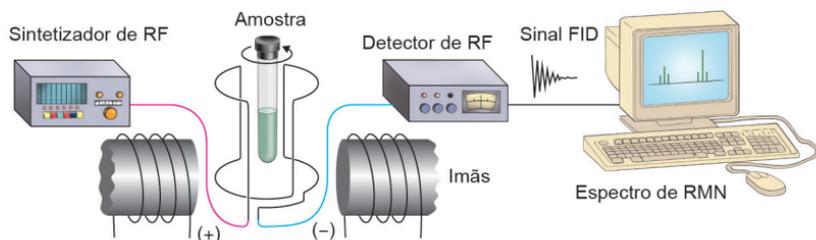
Refleta

A ocorrência de sinais a diferentes frequências, embora sendo o mesmo núcleo, indica que o campo magnético experimentado por cada núcleo depende da vizinhança desse núcleo na molécula. O campo magnético na posição do núcleo será, então, inferior ao campo aplicado, devido a que os elétrons exercem uma blindagem magnética do núcleo.

Em outras palavras, perguntamos: podemos concluir que a principal razão para a ocorrência de desvios químicos em RMN são os elétrons?

Como mencionado anteriormente, existem os espectrômetros de linha larga e os de alta resolução. Os de linha larga têm ímãs com intensidade de poucos décimos de tesla, e são muito mais simples e de baixo custo. Os de alta resolução são equipados com ímãs com intensidade de 1,4 a 23 Tesla. Antes de 1970, estes últimos eram do tipo onda contínua, usando ímãs permanentes para gerar o campo magnético. Todavia, hoje, eles foram substituídos pelos de transformada de Fourier (FT-RMN), que usam ímãs supercondutores para gerar o campo magnético. O custo dos FT-RMN é bastante elevado, podendo facilmente chegar a um milhão de dólares (Figura 4.10).

Figura 4.10 | Esquema simplificado de um FT-RMN



Fonte: adaptada de <<http://www.monografias.com/trabajos101/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear.shtml>>. Acesso em: 30 jun. 2017.



Assimile

Três são os requerimentos essenciais para uma análise de RMN:

1. Um campo magnético homogêneo e intenso.
2. Uma fonte de radiação de RF para excitar os núcleos da amostra.
3. Um método para detectar o sinal de RMN.

Devido à grande utilização do FT-RMN, falaremos especificamente dos componentes básicos desse equipamento.

- Ímã: é considerado o coração da RMN. Tanto a sensibilidade quanto a resolução da técnica estão relacionadas à qualidade e à intensidade do ímã. Em TF, são usados ímãs solenoides supercondutores, os quais produzem campo de alta intensidade, baixo custo de operação, estabilidade e tamanho pequeno. Para

evitar flutuações no campo, sistemas de trava de frequência-campo, bobinas de homogeneização e rotação da amostra são empregados.

- Sonda da amostra: é responsável por manter a amostra em posição fixa no campo magnético, além de conter uma turbina de ar que gira a amostra e bobinas que permitem a excitação e detecção do sinal RMN.

- Sistema de detecção e processamento de dados: o sinal de rádio de alta frequência é convertido em sinal de frequência de áudio, muito mais fácil de ser digitalizado.

Um aspecto muito importante em RMN é o preparo da amostra. Geralmente, soluções de amostra com concentração entre 2-15% é utilizada, mas amostras líquidas puras também podem ser analisadas, desde que tenham baixa viscosidade. Os solventes não podem ter picos de ressonância na região de interesse, e o mais utilizado para compostos orgânicos é o clorofórmio deuterado ($CDCl_3$). Atualmente, a técnica de RMN de ^{13}C é também empregada para sólidos como polímeros e combustíveis fósseis.

Como já citamos, quatro são os núcleos mais importantes na RMN: 1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P , sendo os dois primeiros, certamente, os mais comuns, já que são os átomos mais comuns presentes em compostos orgânicos. O RMN de ^{13}C , apesar de ter sido estudado desde 1957, só começou a ser utilizado mais recentemente, quando instrumentos suficientemente sensíveis foram desenvolvidos, capazes de detectar o fraco sinal de RMN do núcleo de ^{13}C . Em relação ao RMN de prótons, o RMN de ^{13}C apresenta algumas vantagens, como o fato de fornecer informações sobre o esqueleto da molécula (não sobre a periferia) e de serem observados menos desdobramentos e sobreposições nos espectros. O desdobramento *spin-spin* não ocorre, pois é difícil encontrar dois ^{13}C adjacentes.

Uma das grandes vantagens da RMN é a capacidade dela de fornecer informações quali e quantitativas sem o uso de padrões externos e sem a necessidade de uma separação prévia dos analitos de interesse de uma amostra. Como a ressonância magnética é uma técnica analítica não destrutiva, ela é especialmente útil para a análise de sistemas vivos.

Na área farmacêutica, a RMN tem sido utilizada para determinação de pureza de ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs),

análise quantitativa de insumos farmacêuticos (IFAs), excipientes e impurezas. Pode também determinar solventes residuais e isômeros. É uma alternativa à CLAE quando padrões não estão disponíveis, como na análise de impurezas ou em fases iniciais do desenvolvimento de uma droga. Com relação ao desenvolvimento de novas drogas, a RMN permite, além de confirmar a estrutura molecular delas, que conheçamos a estrutura da ligação ao receptor, do complexo formado e da sua dinâmica no local. Além disso, é uma técnica de excelência na confirmação de uma estrutura química e para fornecer informações detalhadas dela.

Não poderíamos terminar esta seção sem falar brevemente sobre a RMN por imagem. Aqui, os dados de excitação pulsada de RF de objetos sólidos ou semissólidos são submetidos à transformação de Fourier e convertidos em imagens tridimensionais do interior desses objetos. Cada pulso de RF produz um sinal FID, que codifica a concentração de prótons naquela região específica.



Exemplificando

A RMN por imagem tem como uma de suas grandes vantagens a possibilidade de que sejam adquiridas imagens de objetos de forma não-invasiva.

No link disponibilizado a seguir, podemos ver o funcionamento dessa técnica na área médica. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=lsdz3llzUDI>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

Sem medo de errar

Gustavo precisava resolver logo a questão envolvendo a manutenção das análises durante o período de reforma do laboratório. Juliana, coordenadora do laboratório RXX, já colocou à disposição de Gustavo e sua equipe um RMN para uso por período integral. No entanto, ele não tinha certeza se essa era a melhor opção para resolver seus problemas.

No lugar de Gustavo, o que você faria? Aceitaria ou não a oferta de utilização deste equipamento?

Considerando o que já vimos nesta seção e nas anteriores,

provavelmente, você já sabe qual a melhor resposta para essa pergunta, correto?

Geralmente, em um laboratório de análises clínicas, grande parte das análises se baseia em testes imunológicos, colorimétricos ou fluorimétricos tradicionais de substâncias presentes no nosso organismo. Ou seja, o objetivo é quantificar um composto presente, em muitos casos, em baixas concentrações em amostras reais e complexas, como sangue, urina, secreções, entre outras.

Como vimos anteriormente, o objetivo do uso da RMN na área farmacêutica é, principalmente, para a elucidação de estruturas de moléculas orgânicas, a identificação de impurezas de elementos desconhecidos em amostras complexas, a determinação de pureza de um insumo, a quantificação dos componentes de uma amostra e o controle de qualidade de produtos químicos, farmacêuticos e afins. Uma rápida busca na literatura nos permite concluir esse fato.

Em outras palavras, existe uma área importante da RMN focada em análises quantitativas, tanto que tem aplicação na área de controle de qualidade de produtos. Métodos de RMN de ^1H (mais comuns e que respondem melhor) podem ser desenvolvidos e validados conforme legislação vigente e utilizados para determinações quantitativas de formulações farmacêuticas, impurezas e excipientes. Vale lembrar que, como todos os compostos orgânicos contêm hidrogênio, a técnica pode ser considerada universal para os compostos orgânicos.

No entanto, nas análises clínicas, o foco não é nenhuma dessas citadas anteriormente. Outro aspecto a ser considerado por Gustavo é o tempo que ele e sua equipe demandariam para desenvolver e validar esses métodos em um equipamento totalmente novo para a equipe. Provavelmente, seriam necessários treinamentos e muitos testes para ver a resposta da RMN de ^1H para cada composto nos limites de referência já estabelecidos pelo laboratório, já que a resposta é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que absorvem energia na radiofrequência referente a esse sinal.

Considerando todas essas questões, a melhor opção para Gustavo seria não arriscar, afinal de contas, ele não poderia dispor desse tempo precioso para treinar e conhecer um novo equipamento. Por mais que sua sede por conhecimento o

impulsionava a aceitar o empréstimo do equipamento, a melhor coisa seria ponderar sobre o assunto e abrir mão da chance de conhecer e trabalhar com esse equipamento fantástico, ao menos neste momento.

Assim, a melhor alternativa seria entrar em contato com outros laboratórios igualmente acreditados para a realização das análises de interesse nos limites que Gustavo precisava e, assim, terceirizar as análises durante esse curto período de tempo.

Avançando na prática

RMN na análise de alimentos

Descrição da situação-problema

Nas últimas décadas, o uso da espectroscopia de RMN para a caracterização e análise de alimentos deu um grande salto científico, e percebe-se que essa tendência continua a crescer. Alguns exemplos conhecidos na literatura são o uso da RMN para análise de vinhos, azeite, mel, café, entre outros produtos alimentícios.

Considerando seu conhecimento sobre o assunto, cite uma possível aplicação da RMN para cada uma dessas matrizes citadas.

Resolução da situação-problema

Na situação-problema proposta, quatro matrizes diferentes foram citadas: vinho, azeite, mel e café.

Já vimos o grande potencial da técnica na análise de produtos adulterados. Considerando a análise de vinho, a RMN pode ser utilizada para detectar adulterações, além de detectar diferenças na variedade do vinho e também quanto à origem geográfica dele. Isso porque diferentes quantidades dos principais componentes, como ácido tartárico, ácido málico, ácido lático, ácido succínico, ácido acético, água e etanol podem ser indicativos de variedade e origem.

Já para a análise de azeite, a espectroscopia de RMN é uma ferramenta valiosa para determinar os compostos bioativos e para a certificação de produtos. Também permite verificar se um vidro de azeite está adulterado, com a mistura de óleo de soja, por exemplo.

Na análise de mel, a técnica pode ser utilizada para detectar adulterações, como a adição de açúcares exógenos (cana-de-

açúcar) e caracterização quanto à planta de origem (eucalipto, laranjeira, silvestre), solo, tipo de abelhas etc.

Por último, na análise de café, é possível realizar a autenticação do café de acordo com sua origem e avaliar a presença de adulterantes, como a cevada e o centeio.

Faça valer a pena

1. A espectroscopia de RMN é baseada na absorção e reemissão de radiação eletromagnética, que ocorre quando os _____ de determinados(as) _____ imersos(as) em um campo eletromagnético _____ são expostos(as) a um segundo campo magnético _____.

Assinale a alternativa que indica o correto preenchimento das lacunas.

- a) elétrons – moléculas – estático – oscilante.
- b) elétrons – átomos – oscilante – estático.
- c) núcleos – moléculas – estático – oscilante.
- d) núcleos – átomos – estático – oscilante.
- e) núcleos – átomos – oscilante – estático.

2. A técnica de espectroscopia na RMN é muito utilizada na área farmacêutica, tanto para fins qualitativos quanto quantitativos. Dentre as principais vantagens da RMN quantitativa está o fato de que a intensidade do sinal integrado é diretamente proporcional ao número de átomos do grupo molecular responsável pelo sinal.

Outra vantagem da espectroscopia de RMN é permitir a análise quantitativa de:

- a) Amostras complexas, sem a necessidade de confeccionar curvas de calibração e sem a necessidade de padrões analíticos idênticos ao analito.
- b) Amostras complexas, sem o uso de padrões internos, algo impossível nos métodos cromatográficos, espectrometria de massa, fotométrico e outros métodos de análise utilizados.
- c) Amostras complexas, sem a necessidade de uso de padrão interno, mas somente de curvas de calibração com padrões externos.
- d) Amostras simples, sem a necessidade de uso de padrão interno, mas somente de curvas de calibração com padrões externos.
- e) Amostras simples, sem a necessidade de padrões analíticos idênticos ao analito, podendo ser qualquer outro padrão que permita a construção de uma curva de calibração.

3. A frequência da radiação de radiofrequência absorvida por um dado núcleo é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, ou seja, pelos elétrons e núcleos vizinhos.

Em relação ao efeito do ambiente químico, assinale as afirmações a seguir enquanto verdadeiras (V) ou falsas (F):

[] O desdobramento *spin-spin* é causado por pequenos campos magnéticos gerados por elétrons que circulam ao redor dos núcleos.

[] No deslocamento químico, para um núcleo de hidrogênio isolado, a constante de blindagem será igual a zero.

[] O desdobramento *spin-spin* ocorre quando o momento magnético de um núcleo interage com momentos magnéticos de outros núcleos adjacentes.

[] No desdobramento *spin-spin*, o campo elétrico criado pela rotação de um núcleo afeta a distribuição de elétrons em suas ligações com outros núcleos, afetando a ressonância.

Assinale a alternativa que apresenta a sequência correta:

a) V - V - V - F.

b) V - F - F - V.

c) F - V - V - V.

d) F - V - F - V.

e) F - F - V - F.

Seção 4.3

Espectrometria no Infravermelho

Diálogo aberto

A área de controle de qualidade de uma grande indústria farmacêutica, multinacional localizada no Brasil, foi selecionada junto a outros quatro laboratórios do mesmo grupo, para realizar, pelo período de seis meses, testes com a técnica de infravermelho próximo. O objetivo dos coordenadores dos laboratórios seria introduzir esses equipamentos para realização do doseamento de diferentes ativos nos medicamentos produzidos pela indústria. Se os resultados fossem promissores, a ideia seria expandir o uso da técnica para a fábrica de produção, para realizar o doseamento na própria linha de produção do medicamento.

Após receber essa demanda, os analistas se organizaram para iniciar os testes no novo equipamento. Decidiram iniciar com o piroxicam, um dos medicamentos mais produzidos pela fábrica brasileira.

O piroxicam é um anti-inflamatório não-esteroidal que inibe, não seletivamente, a atividade das enzimas cicloxigenases. O medicamento é utilizado no tratamento de artrite aguda, artrite reumatoide, inflamação não-reumática e osteoartrite.

As principais farmacopeias indicam a identificação do piroxicam por espectroscopia no infravermelho e espectrofotometria no ultravioleta, além de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia delgada. No controle de qualidade da indústria, a técnica é utilizada há mais de dez anos para o doseamento do fármaco era a CLAE com detector de ultravioleta. Essa técnica era utilizada para todas as formas farmacêuticas produzidas, ou seja, cápsulas, comprimidos solúveis, comprimidos de dissolução instantânea, supositórios, suspensão oral e solução intramuscular. Assim, o modo de preparo variava conforme a forma farmacêutica, mas o método cromatográfico era o mesmo para todas.

Pensando nesta mesma linha, os analistas decidiram que iriam

tentar desenvolver uma mesma metodologia para o doseamento por NIR. Afinal de contas, o fármaco era o mesmo, só mudava a forma de apresentação.

Na sua opinião, a decisão da equipe foi correta? Justifique sua resposta.

Não pode faltar

No início do século XIX, o astrônomo William Herschel buscava descobrir a capacidade de cada cor de produzir calor. Para isso, ele utilizou um termômetro de mercúrio em cada uma das cores obtidas por um prisma. Notou que cada uma tinha sua porção de calor, mas que o vermelho era a que mais apresentava calor. Depois do vermelho, havia uma região sem luz, mas que conseguia produzir temperaturas maiores que o vermelho. A partir daí se descobriu que havia uma radiação, não visível, mas presente, que foi chamada, por esse motivo, de radiação infravermelha.

A radiação infravermelha é uma radiação não ionizante, por isso, sem efeitos danosos. No espectro de luz, está localizada depois da luz vermelha, ou seja, entre a luz visível e o micro-ondas. Apesar de não poder ser vista, a radiação infravermelha pode ser notada no corpo na forma de calor em terminações nervosas, chamadas termorreceptores, que conseguem captar essa radiação.



Refleta

Você já sentiu a radiação infravermelha no seu corpo?

Se sua resposta for não, pense no que seu corpo sente quando, mesmo em escuridão total, um objeto quente, como uma brasa ou um ferro de passar roupa, é aproximado de você.

A faixa do espectro eletromagnético que compreende a radiação infravermelha vai desde 0,7 até 1000 μm . Por questões de ordem prática, o infravermelho é dividido em três regiões, chamadas de infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), médio (MIR, do inglês *mid infrared*) e distante (FIR, do inglês *far infrared*), conforme o Quadro 4.1.

Quadro 4.1 | Regiões espectrais do infravermelho

Região	Comprimento de onda (λ , μm)	Número de onda ($1/\lambda$, cm^{-1})
Próximo (NIR)	0,78 – 2,5	12.000 – 4.000
Médio (MIR)	2,5 – 50	4.000 – 200
Distante (FIR)	50 – 1.000	200 – 10
Mais utilizada	2,5 - 15	4.000 - 670

Fonte: adaptado de Holler, Skoog e Crouch (2009) e Soares (2006).

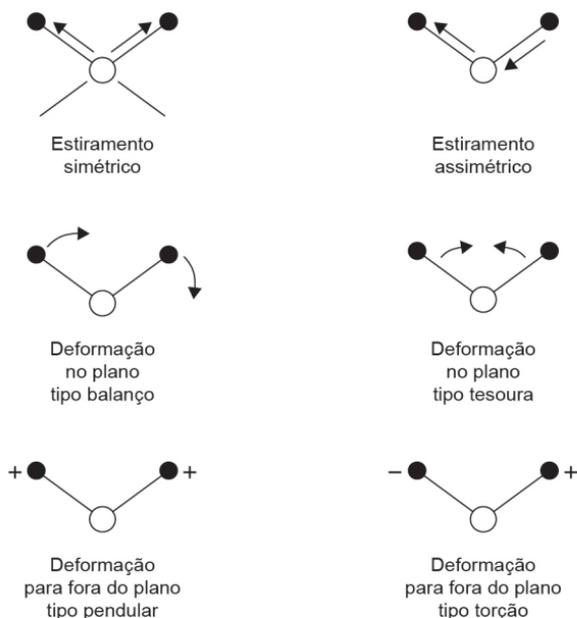
As bandas de absorção no infravermelho são expressas como comprimento de onda ou número de onda, por isso, é importante lembrar que o número de onda é o inverso do λ (μm), ou seja, é $1/\lambda$ (cm^{-1}), e que a conversão entre eles é de $1 \text{ cm}^{-1} = 10^4 \mu\text{m}^{-1}$.

A região do NIR tem sido bastante utilizada para a quantificação de compostos e para a diferenciação entre materiais de mesma natureza por meio da comparação dos perfis dos espectros. A região do NIR também tem sido utilizada no controle de processos nas indústrias. A região do MIR tem se mostrado uma ferramenta poderosa na confirmação da identidade de compostos através da indicação da presença ou não de certos grupos funcionais. Atualmente, após o aparecimento dos MIR com transformada de Fourier, a técnica também tem sido empregada para análises quantitativas de algumas amostras complexas. Já a região do FIR, historicamente, tem sido pouco utilizada e, devido a isso, não falaremos sobre a espectroscopia na região do FIR.

Uma das grandes vantagens das análises por infravermelho é que é uma análise não destrutiva e se aplica a amostras no estado gasoso, líquido e sólido.

Já sabemos que em uma molécula os átomos não estão estáticos um em relação ao outro. Pelo contrário, as ligações entre os átomos estão sempre vibrando. Essas vibrações não ocorrem de forma aleatória, e podem ser do tipo estiramento ou deformação. Nos estiramentos ocorrem aumentos ou diminuições nas distâncias interatômicas; e nas deformações ocorre alteração nos ângulos das ligações entre os átomos (Figura 4.11).

Figura 4.11 | Tipos de vibrações moleculares



Fonte: Soares (2006).

Os níveis de energia dessas vibrações são quantizados e a presença de uma radiação no infravermelho pode provocar a mudança entre eles. Assim, os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho se originam de numerosas variações de energia produzidas por transições de moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro.



Assimile

É importante considerar que a radiação infravermelha não é tão energética como a visível ou ultravioleta, por isso, não é suficiente para produzir transições eletrônicas (entre E_0 , E_1 e E_2). A radiação infravermelha se limita a produzir alterações nos estados vibracionais e rotacionais dentro de um mesmo nível eletrônico (para mais detalhes, leia o item *Não pode faltar* da Seção 3.1).

Para que ocorra absorção no infravermelho, dois requisitos devem ser seguidos. O primeiro é que a excitação de uma molécula, de um nível de energia vibracional para outro, ocorra apenas quando o composto absorve a radiação no infravermelho de uma energia específica, significando um λ ou frequência (ν) específica. O segundo requisito é que a molécula sofra variação no momento dipolar, durante seu movimento rotacional ou vibracional, ou seja, deve haver uma distribuição desigual entre as nuvens eletrônicas dos átomos que compõem a ligação. Moléculas simétricas, como espécies mononucleares de O_2 , N_2 ou Cl_2 , apresentam momento dipolar nulo, por isso, não ocorre absorção de radiação no infravermelho para estiramentos e deformações oriundas dessas moléculas.



Exemplificando

No caso de uma molécula de ácido clorídrico (HCl), a distribuição de carga não é simétrica devido à alta densidade eletrônica do cloro. Assim, podemos dizer que a molécula possui um momento dipolo significativo polar.

Se a frequência gerada por uma fonte de radiação externa aplicada à amostra for igual à frequência de vibração natural da molécula, ocorre a absorção da radiação, causando uma variação na amplitude da vibração molecular.

A força de ligação entre os átomos determinará a energia necessária para modificar seu estado vibracional. Assim, no caso de ligações simples e átomos de massa baixa, pouca energia será necessária para aumentar seu nível vibracional. Já átomos de massa alta e envolvidos em ligações duplas ou triplas precisarão de uma energia maior para alterar seu nível vibracional.

Todos os tipos de vibrações mostrados na Figura 4.11 são possíveis em moléculas que contêm mais de dois átomos. Além disso, é possível estimar o número de vibrações fundamentais possíveis (sem considerar interações e acoplamentos, como veremos a seguir). Para moléculas não lineares, utiliza-se a fórmula $3N - 6$, em que N é o número total de átomos na molécula. Já para moléculas lineares, $3N - 5$. Esse número pode ser reduzido

em alguns casos, como quando bandas fundamentais são fracas a ponto de não serem observadas, quando as vibrações fundamentais são tão fracas que coalescem, quando as bandas são degeneradas, quando há pouca variação no dipolo da molécula e quando as frequências fundamentais caem fora da região entre 2,5 e 15 μm considerada a região ideal para observação do fenômeno.

No entanto, a situação real de uma molécula poliatômica geralmente é diferente. Isso porque o λ do máximo de absorção pode ser influenciado pelas interações ou acoplamentos de vibrações da molécula. Essas transições, chamadas de sobretons, originam bandas mais fracas do que as fundamentais e são ditas transições proibidas. O acoplamento de vibrações é um efeito comum na maioria das moléculas e, como consequência, a posição de uma banda de absorção correspondente a um dado grupo funcional não pode ser exatamente especificada. Apesar disso, são esses mesmos efeitos que fornecem características únicas de um espectro de absorção no infravermelho próximo.



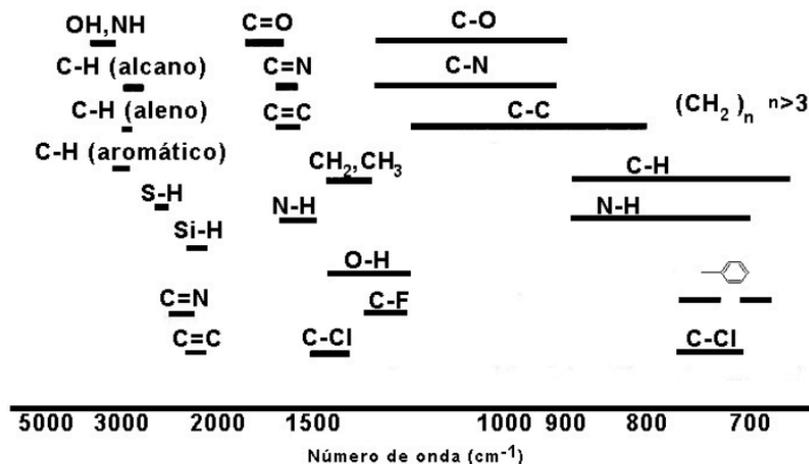
Exemplificando

Um exemplo típico de acoplamento de vibrações é o que ocorre no estiramento C-O das moléculas de metanol, etanol e 2-butanol. Devido ao acoplamento do estiramento C-O com os estiramentos adjacentes C-C e C-H, a frequência do estiramento C-O no metanol, etanol e 2-butanol é, respectivamente, 1034 cm^{-1} (9,67 μm), 1053 cm^{-1} (9,50 μm) e 1105 cm^{-1} (9,05 μm).

Vamos, agora, falar um pouco sobre a espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR) especificamente.

No espectro MIR aparecem as vibrações fundamentais, ou seja, as vibrações referentes aos diferentes grupos funcionais que absorvem radiação no infravermelho (Figura 4.12). São dados que fornecem informações estruturais a partir das frequências de absorção características de cada grupo funcional.

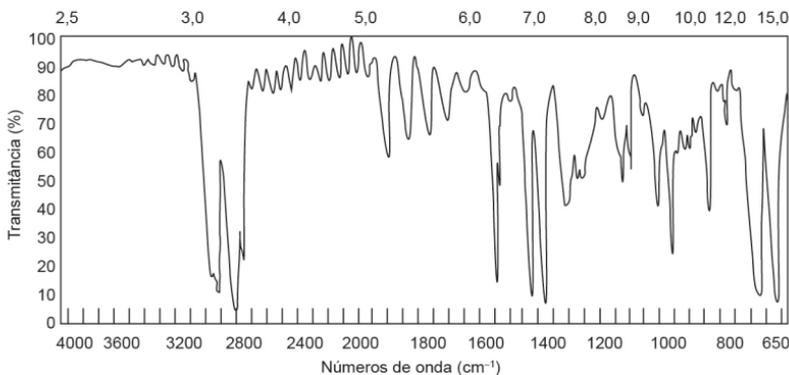
Figura 4.12 | Bandas de absorção no infravermelho



Fonte: adaptado de <<https://goo.gl/fdxW5Y>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

O fato de os espectros na região do MIR serem inconfundíveis (não apresentarem sobretons, só vibrações fundamentais) torna a técnica especialmente útil na identificação de compostos e confirmação através da comparação com espectros de substâncias puras. Na Figura 4.13, temos um exemplo típico de um espectro na região do MIR.

Figura 4.13 | Exemplo de um espectro na região do infravermelho médio (MIR)



Fonte: Soares (2006).



Cada região de absorção no MIR corresponde a alguns estiramentos possíveis. Por exemplo:

- Bandas fortes na região entre 3600 e 3200 cm^{-1} indicam estiramento axial dos grupos -OH , -NH- ou C-H .
- Bandas fortes em torno de 2900 cm^{-1} indicam a presença do estiramento C-H (aparecem em quase todos os espectros de compostos orgânicos).
- Bandas fortes na região entre 1850 e 1650 cm^{-1} indicam estiramento da carbonila.
- Bandas fortes entre 900 e 650 cm^{-1} indicam vibração angular fora do plano de C-H de aromáticos. A confirmação do anel é feita na região de $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, através da banda de absorção da ligação C=C do anel.
- Bandas fortes ou médias entre 2300 e 2000 cm^{-1} indicam presença de ligação $\text{C}\equiv\text{C}$ e $\text{C}\equiv\text{N}$ de alcinos e nitrilas, respectivamente.
- Bandas fortes na região entre 1200 e 1000 indicam estiramento C-O de álcool, éteres etc.

Os instrumentos para MIR podem ser do tipo dispersivos ou não dispersivos, sendo os últimos os mais utilizados. Estes praticamente substituíram os primeiros.

Os instrumentos não dispersivos são baseados no interferômetro de Michelson e na transformada de Fourier, por isso, também são conhecidos como FT-IR (do inglês *Fourier transform infrared*). Neste caso, além da fonte e do detector, como qualquer espectrofotômetro clássico, ao invés de um monocromador, eles possuem um interferômetro. No interferômetro, o feixe da fonte é dividido em dois e o caminho óptico de um deles é modificado, movimentando-se um espelho. Após passarem pela amostra, os dois feixes são recombinados e o espectro de absorbância é obtido por transformada de Fourier. A transformada realiza a deconvolução (procedimento matemático que aumenta a resolução de um espectro) dos feixes de radiação em cada λ ,

fornecendo um espectro de absorbância (ou transmitância) por λ . Dentre as vantagens dos FT-IR, estão a melhor relação sinal/ruído, a eliminação da radiação espúria, a rapidez e a exatidão.

Em relação às fontes, elas consistem em um sólido inerte que é aquecido eletricamente a uma temperatura entre 1500 e 2200 K, produzindo radiação contínua semelhante à de um corpo negro. As fontes mais utilizadas são a fonte de Nernst (cilindro oco composto de uma mistura de óxidos de terras raras), a fonte Global (barra de carbeto de silício) e a fonte de filamento incandescente (espiral de fio de níquel-cromio).

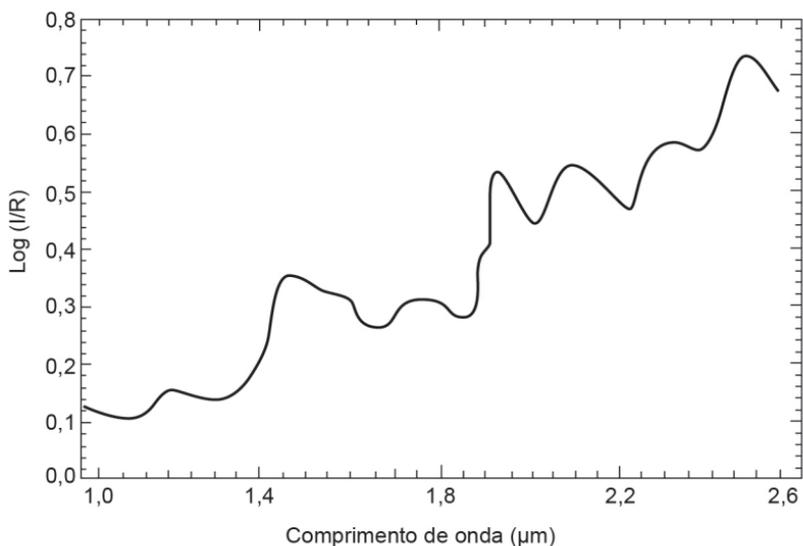
Já os detectores são de três tipos: (1) os piroelétricos, compostos por camadas monocristalinas de material piroelétrico isolante, geralmente, sulfato de triglicina (alterando sua temperatura pela incidência de radiação infravermelha, altera-se a distribuição de cargas no cristal, que pode ser detectada em um circuito elétrico externo), (2) os fotocondutivos (filme fino de material semicondutor, como sulfeto de chumbo, que altera sua condutividade de acordo com a quantidade de radiação que atinge sua superfície) e (3) os térmicos (uso limitado aos instrumentos dispersivos).

O preparo de amostras para medidas na região do MIR deve ser realizado com bastante cuidado, já que os únicos materiais que não apresentam absorção nessa região do espectro são os sais com ligações iônicas. Por isso, análises qualitativas de amostras sólidas são preparadas por moagem com brometo de potássio (KBr) e, em seguida, molda-se uma pastilha a ser introduzida no equipamento para análise. Obviamente, as quantidades utilizadas devem ser padronizadas para permitir análises confiáveis. Já no caso de análise de líquidos, solventes orgânicos, como o CCl_4 , geralmente, são usados para solubilizar a amostra, pois não apresentam absorção nessa região. As cubetas utilizadas também precisam ser de NaCl, AgCl ou outro sal que não absorva nessa região espectral. As medidas quantitativas obedecem à Lei de Beer, porém, em razão da complexidade dos espectros, utiliza-se correção de linha de base para a obtenção das absorbâncias. No entanto, a maior utilização do MIR é para medidas qualitativas.

A outra região do espectro infravermelho que estudaremos nesta seção é o NIR. Nela, ocorrem as bandas de absorção de sobretons e de combinação. Dentre as utilizadas, temos os

primeiros sobretons relacionados ao estiramento C-H, O-H e N-O. O primeiro sobreton apresenta cerca de um décimo da absorvância da vibração fundamental, enquanto que o segundo, um centésimo da fundamental. Como a intensidade da banda é crucial para sua detecção, segundos e terceiros sobretons são pouco utilizados nas medidas. Assim, poucas bandas podem ser utilizadas, limitando-se ao estiramento da ligação C-H e seu primeiro sobreton e os sobretons dos estiramentos das ligações O-H e N-O. Na Figura 4.14, temos um espectro característico obtido na região do NIR, em que é possível ver a grande diferença entre ele e um espectro na região do MIR (Figura 4.13).

Figura 4.14 | Exemplo de um espectro de reflectância difusa na região do infravermelho próximo (NIR).



Fonte: Soares (2006).

Tanto as medidas de reflexão difusa como as de transmissão são utilizadas, sendo a reflectância difusa, em geral, empregada para amostras sólidas; e a transmitância, para líquidos. A reflectância difusa resulta de uma combinação de fenômenos de reflexão, refração e difração, e é característica de cada material, dependendo das suas propriedades físicas e químicas, como forma da partícula, densidade do material, tipo e intensidade da radiação.

O feixe de radiação que penetra no material a ser analisado sofre vários desses fenômenos e, ao emergir da amostra em direção ao detector, possui menos energia, pois parte dela foi absorvida em λ específicos e correspondentes aos espectros de absorção dos constituintes do material e parte foi espalhada. Devido a essa importância tão grande das propriedades físicas e químicas da amostra, métodos específicos devem ser desenvolvidos para amostras, como milho em grãos e milho moído, ou ainda para milho, soja e arroz.

Do complexo espectro obtido, normalmente selecionam-se regiões de interesse para serem efetivamente utilizadas para as determinações analíticas. Assim, escolhem-se as regiões com os λ correspondentes ao constituinte de interesse, bem como λ que sofrem menos interferências de outros λ . Em seguida, um modelo matemático de calibração é desenvolvido. Nesta fase, é importante a comparação das análises obtidas por NIR com as obtidas pela metodologia de referência (de bancada), e também que grande número de amostras seja analisado pelos dois métodos. Todos esses dados são colocados no modelo matemático e um modelo de calibração é obtido. Em seguida, para testar a validade das constantes estabelecidas nesse modelo, amostras de concentração conhecida (e que não foram utilizadas para a construção do modelo de calibração) são analisadas.

Quatro tipos de instrumentos existem para a região do NIR: (1) os com rede de difração (similares aos utilizados na região do UV-Vis); (2) os com filtros discretos (discos selecionam os λ); (3) os instrumentos com filtros óptico-acústicos sintonizáveis (difratam a radiação em λ determinados por um sinal de RF aplicado); e (4) os espectrofotômetros com transformada de Fourier, sendo esses últimos os mais utilizados. A sua grande reprodutibilidade no λ e a razão sinal/ruído são os grandes diferenciais.

As fontes são, usualmente, lâmpadas de tungstênio-halogênio com janelas de quartzo e cubetas de quartzo ou sílica fundida transparentes até 3000 nm. Os detectores podem ser do tipo fotocondutores de PbS ou PbSe ou fotodiodos de InGaAs.

Ao contrário do MIR, as técnicas de NIR têm sido mais empregadas para determinações quantitativas, como na quantificação de componentes majoritários em alimentos,

como água, proteínas, lipídios e carboidratos. As técnicas também têm sido empregadas na caracterização de origem, variedade ou processamento de um material, como café descafeinado e com cafeína, sucos de diferentes procedências, chás de diferentes regiões etc. A diferenciação é realizada por comparação do espectro entre um material autêntico e um da amostra desconhecida. A amostra e a substância de referência, quando for o caso, devem ser preparadas simultaneamente, em condições idênticas.

Tanto para análise quali quanto quantitativa, quanto maior for o banco de dados com espectros de determinado grupo de amostras, melhor. Por exemplo, em uma análise de lipídios em amostras de milho em grão, quanto maior a variabilidade de amostras de milho, com concentrações de lipídios das mais diversas, mais robusto será o modelo e mais fácil será a quantificação correta de uma amostra desconhecida.



Pesquise mais

Para conhecer mais dos experimentos realizados por Herschel e sobre os fundamentos da espectroscopia de infravermelho, não deixe de assistir ao vídeo disponibilizado no link a seguir:

Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=BYCaANLWv3I>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

Sem medo de errar

O laboratório de controle de qualidade de uma grande multinacional localizada no Brasil recebeu um espectrômetro NIR para realização de testes nesse novo equipamento. Como um dos medicamentos de linha de frente da fábrica no Brasil é o piroxicam, a equipe decidiu iniciar os testes com todas as formas farmacêuticas dos medicamentos produzidos que contêm o piroxicam como ativo. Assim, cápsulas, comprimidos solúveis, comprimidos de dissolução instantânea, supositórios, suspensão oral e solução intramuscular foram separados para serem analisados no equipamento.

O objetivo da equipe é desenvolver um método único por NIR para determinar o ativo em todas essas formas farmacêuticas,

assim como já era realizado pelo laboratório pela técnica CLAE.

Depois de tudo o que você viu nesta seção, qual é a sua opinião sobre essa decisão?

Acreditamos que você já sabe a resposta para esta questão, não é mesmo?

Duas formas de medidas podem ser utilizadas no NIR: a reflectância difusa, muito mais utilizada para sólidos, e a transmitância, utilizada para líquidos. Assim, já podemos descartar a possibilidade de analisar sólidos e líquidos com a mesma metodologia.

E quanto às várias formas sólidas que serão analisadas por reflectância difusa?

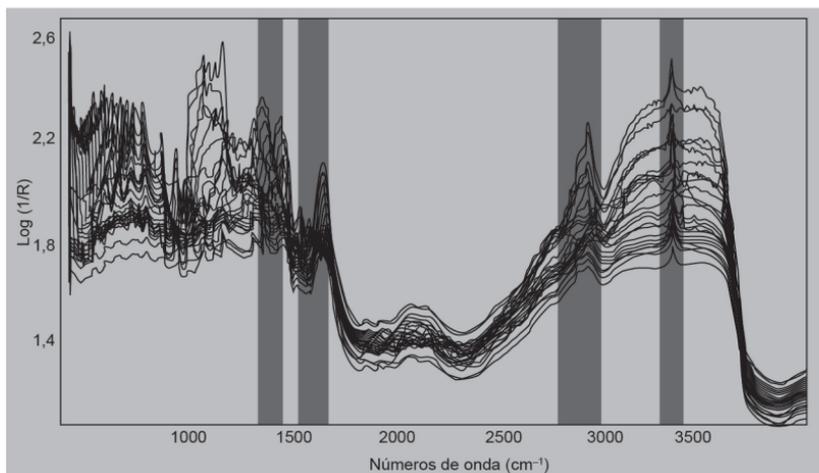
Como vimos, a reflectância difusa resulta de uma combinação de vários fenômenos, como reflexão, refração e difração, e é característica de cada material, dependendo, inclusive, da forma da partícula, da densidade do material, do tipo e da intensidade da radiação. Por isso, pensando especificamente nas formas descritas anteriormente para medicamentos à base de piroxicam, vários fatores podem interferir na medida, como a granularidade, a compressibilidade do comprimido, a densidade do material, os excipientes utilizados e a forma das partículas.

Essas características tão particulares da técnica fazem com que métodos específicos devam ser desenvolvidos para cada forma farmacêutica contendo o mesmo ativo. Agora, dentro de cada forma farmacêutica a ser analisada, é importante ter uma variabilidade no teor do fármaco. Isso porque, para medidas quantitativas, é necessária a construção de modelos de calibração. Tomando como exemplo os comprimidos solúveis, o ideal é ter comprimidos de 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, enfim, quanto maior a variação, melhor para o modelo, pois quando chegar uma amostra nova, será mais fácil de o modelo prever a sua concentração.

Outra situação muito importante de ser observada pela equipe é que a mesma amostra deve ser analisada tanto pelo NIR como pela técnica tradicional, no caso, a CLAE. Isso porque os resultados quantitativos obtidos pela CLAE são incorporados no modelo matemático e, assim, é possível correlacionar um resultado

quantitativo da CLAE com uma alteração em uma faixa de λ do espectro. Na Figura 4.15, temos um exemplo de uma seleção de λ ao longo de um espectro NIR de piroxicam, retirado de um artigo publicado por Parisotto et al. (2005).

Figura 4.15 | Seleção das regiões espectrais empregadas para análise multivariada por reflectância difusa com transformada de Fourier



Fonte: Parisotto et al. (2005).

Mais um detalhe é que, quanto maior for o número de amostras analisadas, mais robusto será o modelo. Por isso, sugere-se utilizar cem amostras diferentes para se obter um bom modelo (na Figura 4.15, é possível visualizar a grande quantidade de amostras analisadas). Esse modelo, agora, precisa ser testado com amostras de concentração desconhecida para que seja constatada sua capacidade de prever o resultado quantitativo do piroxicam. Um modelo de previsão, então, é desenvolvido para tal finalidade.

Assim, uma dica importante para qualquer análise instrumental é que não podemos extrapolar o conceito de uma para a outra. Cada técnica tem suas particularidades, como vimos no decorrer deste semestre. Por isso, é importante conhecer o conceito que está por trás de cada uma delas para que seja tomada sempre a melhor decisão. E esta dica vale para toda a sua vida profissional.

Sucesso!

Ensaio de identificação de piroxicam

Descrição da situação-problema

O mesmo laboratório de controle de qualidade recebeu, agora, outra demanda urgente: testar as mesmas amostras de piroxicam utilizando um espectrômetro na região do infravermelho médio (MIR).

Considerando o que vimos até agora, a mesma abordagem empregada no NIR poderia ser utilizada no MIR? Discuta em termos de preparo de amostra.

Resolução da situação-problema

A técnica MIR não tem grande aplicabilidade nas análises quantitativas, no entanto, é uma excelente opção para ensaios de identificação. Assim, para o doseamento, ela não seria uma boa opção, mas, pensando em termos de análises qualitativas, podemos prosseguir na discussão.

Uma característica importante em termos de preparo de amostras sólidas é a necessidade de se preparar pastilhas com sais iônicos que não absorvem na região do infravermelho, como os haletos de potássio. A amostra sólida (1 a 5 mg) é triturada com cerca de 300 mg de um sal seco e bem pulverizado, e a mistura homogênea é introduzida em um molde e comprimida a vácuo, formando um disco que é fixado em um suporte apropriado e submetido à leitura.

No caso de amostras líquidas, solventes transparentes a essa região espectral devem ser utilizados (por exemplo: tetracloreto de carbono). Já no caso de amostras na forma de pó, o óleo mineral pode ser utilizado como uma alternativa aos solventes orgânicos. Neste caso, a amostra é dispersa no óleo até a obtenção de uma pasta fina e cremosa. Essa pasta é então depositada entre duas placas de cloreto de sódio ou outro sal apropriado, de modo a formar um filme contínuo, que é então submetido à leitura.

No caso de ensaios de identificação, substâncias de referências devem ser preparadas e analisadas simultaneamente à amostra, em condições idênticas.

Faça valer a pena

1. As posições dos átomos em uma molécula não são fixas, mas oscilam continuamente como consequência das vibrações e rotações que ocorrem nas ligações da molécula.

Considerando o contexto apresentado, avalie as seguintes asserções e a relação proposta entre elas.

I. As vibrações podem ser classificadas nas categorias de estiramento e de deformação.

PORQUE

II. Uma vibração de estiramento é caracterizada por uma variação no ângulo entre duas ligações, e pode ser do tipo simétrica ou assimétrica. A respeito dessas asserções, assinale a alternativa correta:

- a) As asserções I e II são proposições verdadeiras, e a II é uma justificativa correta da I.
- b) As asserções I e II são proposições verdadeiras, mas a II não é uma justificativa correta da I.
- c) A asserção I é uma proposição verdadeira, e a II é uma proposição falsa.
- d) A asserção I é uma proposição falsa, e a II é uma proposição verdadeira.
- e) As asserções I e II são proposições falsas.

2. A região do espectro infravermelho, denominada _____, tem grande utilização em análises _____, e seus espectros são caracterizados por bandas de absorção do tipo _____. Já a região denominada _____ tem grande aplicabilidade nas análises _____, e seus espectros são caracterizados por vibrações do tipo _____.

As lacunas do texto são corretamente preenchidas por:

- a) MIR – quantitativas – sobretons – NIR – qualitativas – fundamentais.
- b) FIR – quantitativas – fundamentais – NIR – qualitativas – sobretons.
- c) NIR – qualitativas – sobretons – MIR – quantitativas – fundamentais.
- d) MIR – qualitativas – fundamentais – FIR – quantitativas – sobretons.
- e) NIR – quantitativas – sobretons – MIR – qualitativas – fundamentais.

3. Os instrumentos de medida na região do infravermelho médio são muito parecidos em termos de componentes internos, com os instrumentos utilizados para as medidas na região do ultravioleta e visível, exceto por um componente que foi alterado nos equipamentos MIR com transformada de Fourier.

Assim, um instrumento MIR com transformada de Fourier possui:

- a) Um interferômetro ao invés do monocromador.
- b) Um monocromador ao invés do filtro de absorção.
- c) Uma fotomultiplicadora ao invés de um detector térmico.
- d) Um interferômetro ao invés de uma fotomultiplicadora.
- e) Uma fonte de Nernst ao invés de uma lâmpada de cátodo oco.

Referências

AMORIN, Suellen Resende; KLIER, Anderson Hollerbach; ANGELIS, Lúcia Helena. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Belo Horizonte, v. 94, n. 3, p. 234-242, 2013. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-v94n3-06.pdf>>. Acesso em: 7 jul. 2017.

ANÁLISE INSTRUMENTAL APLICADA A POLÍMEROS. Disponível em: <https://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/aula3b.html>. Acesso em: 5 jul. 2017.

CATALANI, Luiz Henrique. **Espectrometria de massas**. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/lhc/disciplinas/qfl5922-2011/2011_massa_-_bloco_1_-_lique.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

DLE Medicina Laboratorial. **Aminoacidopatias e distúrbios do ciclo da ureia**. Disponível em: <<https://dle.com.br/links-relacionados/aminoacidopatias-e-disturbios-do-ciclo-da-ureia>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

DLE Medicina Laboratorial. **Teste do pezinho expandido**. Disponível em: <<https://dle.com.br/exames/teste-do-pezinho/211-teste-do-pezinho-expandido-profissionais>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. UNESP. Disponível em: <<http://www2.sorocaba.unesp.br/professor/jrborto/2008S2/POSMAT/RMN.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO. Acesso em: 15 nov. 2017. **(Vídeo do YouTube)**. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=BYCaANLWv3I>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

GATTASS, R. et al. **Fundamentos da ressonância magnética funcional**. Disponível em: <<http://www.cerebromente.org.br/n13/tecnologia/ressonancia.htm>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p. Tradução: Célio Pasquini e colaboradores.

INKEMIA BRASIL. **A Ressonância Magnética Nuclear: uma técnica analítica em expansão**. Disponível em: <<https://inkemiabrasil.com/2016/07/19/a-ressonancia-magnetica-nuclear-uma-tecnica-analitica-em-expansao/>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

LANÇAS, Fernando M. A. Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 1, n. 2, p. 37-61, 2009. Disponível em <<http://www.scientiachromatographica.com/files/v1n2/v1n2a4.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

MAGNABOSCO, Caroline. **O screening neonatal expandido para erros inatos do metabolismo**: do surgimento aos dias atuais. Monografia (Especialização

Médica em Neurologia Pediátrica) - Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. <<https://dspace.c3sl.ufpr.br/bitstream/handle/1884/44296/R%20-%20E%20-%20CAROLINE%20MAGNABOSCO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

PARISOTTO, Graciele et al. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 499-505, dez. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000400013>. Acesso em: 8 jul. 2017.

RODRIGUEZ, Rafael Martinez. **Estudo da Emissão de Íons Estáveis e Metaestáveis (LiF)nLi+ Induzida por Fragmentos de Fissão do 252Cf**. 2003. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Departamento de Física, Puc Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003. Cap. 2. Disponível em: <http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802_03_pretextual.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

REGULAMENTO(UE) n° 589/2014 DA COMISSÃO de 2 de junho de 2014. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0589&from=PT>. Acesso em: 28 nov. 2017.

REGULAMENTO (UE) n° 709/2014 DA COMISSÃO de 20 de junho de 2014. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0709&from=EN>. Acesso em: 28 nov. 2017.

SOARES, Lucia Valente. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 337 p.

ThoMSon Laboratório de Espectrometria de Massas, Instituto de Química da UNICAMP. (**Video do YouTube**). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=9J3KovAyl4A>>. Acesso em: 26 jun. 2017

TURMELO, Pablo. **Espectroscopia de ressonância magnética nuclear**. Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos101/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear/espectroscopia-resonancia-magnetica-nuclear.shtml>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

ISBN 978-85-522-0128-1



9 788552 201281 >