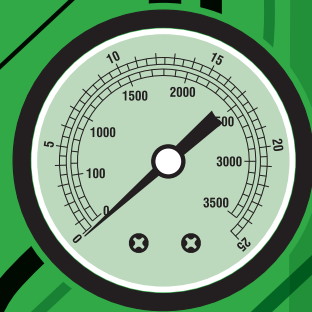


Ronaldo Ferreira do Nascimento
Ari Clecius Alves de Lima
Pablo Gordiano Alexandre Barbosa
Vítor Paulo Andrade da Silva

Cromatografia gasosa

Aspectos teóricos
e práticos




Imprensa
Universitária
UFC


COLEÇÃO
DE ESTUDOS DA
PÓS-GRADUAÇÃO


EDIÇÕES
UFC

Cromatografía gasosa

Aspectos teóricos e prácticos

Presidente da República

Michel Miguel Elias Temer Lulia

Ministro da Educação

Rossieli Soares da Silva

Universidade Federal do Ceará - UFC

Reitor

Prof. Henry de Holanda Campos

Vice-Reitor

Prof. Custódio Luís Silva de Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho

Pró-Reitor de Planejamento e Administração

Prof. Almir Bittencourt da Silva

Imprensa Universitária

Diretor

Joaquim Melo de Albuquerque

Conselho Editorial

Presidente

Prof. Antônio Cláudio Lima Guimarães

Conselheiros

Prof.^a Angela Maria R. Mota Gutiérrez

Prof. Ítalo Gurgel

Prof. José Edmar da Silva Ribeiro

Ronaldo Ferreira do Nascimento
Ari Clecius Alves de Lima
Pablo Gordiano Alexandre Barbosa
Vítor Paulo Andrade da Silva

Cromatografia gasosa

Aspectos teóricos e práticos



Fortaleza
2018

Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos

Copyright © 2018 by Ronaldo Ferreira do Nascimento, Ari Clecius Alves de Lima, Pablo Gordiano Alexandre Barbosa, Vítor Paulo Andrade da Silva

Todos os direitos reservados

IMPRESSO NO BRASIL / PRINTED IN BRAZIL

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)
Av. da Universidade, 2932, fundos - Benfica - Fortaleza - Ceará

Coordenação editorial

Ivanaldo Maciel de Lima

Revisão de texto

Leidyane Viana

Normalização bibliográfica

Marilzete Melo Nascimento

Programação visual

Sandro Vasconcellos / Thiago Nogueira

Diagramação

Thiago Nogueira

Capa

Lana Carolina

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Bibliotecária Marilzete Melo Nascimento CRB 3/1135

C945n Nascimento, Ronaldo Ferreira do.
Cromatografia gasosa [recurso eletrônico]: aspectos teóricos e práticos / Ronaldo Ferreira do Nascimento, Ari Clecius Alves de Lima, Pablo Gordiano Alexandre Barbosa, Vítor Paulo Andrade da Silva. - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.
14124 Kb : il. color. ; PDF (Estudos da Pós-Graduação)

ISBN: 978-85-7485-326-0

1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia gasosa de alta resolução moderna. 3. Validação de métodos cromatográficos. I. Nascimento, Ronaldo Ferreira do. II. Lima, Ari Clecius Alves de. III. Barbosa, Pablo Gordiano Alexandre. IV. Silva, Vítor Paulo Andrade da. V. Título.

CDD 543.8

PREFÁCIO

O livro “**Cromatografia gasosa: teoria e prática**” pretende apresentar de modo didático e compreensível aspectos importantes no estudo de cromatografia gasosa, desde os fundamentos e conceitos básicos, passando pelos parâmetros importantes no preparo de amostra e otimização de sistema de injeção. Quando pertinente, dados experimentais obtidos em pesquisas realizadas pelo grupo do Laboratório de Análises de Traços, vinculado ao Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, são utilizados para ilustração e exemplificação dos itens abordados. Estas pesquisas vêm sendo realizadas ao longo dos anos (1998-2015), contando com a colaboração de inúmeros colegas pesquisadores, docentes, alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica.

Após uma breve introdução, feita de modo a familiarizar o leitor com alguns aspectos básicos importantes da cromatografia gasosa, abordamos pontos fundamentais do preparo de amostras e sistema de injeção. Os capítulos seguintes tratam, respectivamente, das fases estacionárias, dos principais detectores utilizados atualmente com aplicações, do desenvolvimento e validação do método cromatográfico e, por fim, das principais técnicas qualitativas e quantitativas em cromatografia gasosa.

Uma vez que investigações de teorias e aplicações de cromatografia gasosa constituem área de estudos ampla e atual, consideramos que o conteúdo apresentado constitui obra de relevante interesse tanto para o Departamento de Química Analítica e Físico-Química como para estudantes, pesquisadores e demais profissionais de áreas correlatas.

AGRADECIMENTOS

Este projeto não seria possível sem a colaboração de vários parceiros ao longo desses treze anos de trabalho. Citamos, em especial, o Lanágua-UFC, o Labosan-UFC, o LAT-UFC, o Labcaju-NUTEC, o Padetec-UFC, assim como o Departamento de Química Analítica e Físico-Química da UFC. Foram muitas parcerias e contribuições de professores, alunos e profissionais da área que agregaram conhecimento ao grupo do Laboratório de Análise de Traços, a **Família LAT**.

Não podemos deixar de citar os alunos pioneiros nos trabalhos de cromatografia no nosso grupo de pesquisa: Têcia Carvalho, Arlange de Oliveira Furtado, Francisco Wendel Batista de Aquino, Fábio Oliveira da Silva, Dasciana de Sousa Rodrigues, Clayton Campelo, Anayla dos Santos Sousa, Rudy Crisafully, André Gadelha, Francisco Wagner de Sousa e Rivelino Martins Cavalcante.

Agradecimentos especiais aos professores: Douglas Wagner, Afrânio Craveiro, Rivelino Martins, Francisco Wagner, Elisane Longhnotti, André Bezerra, Ronaldo Stefanutti, Danilo Caldas, Edilberto Silveira, Alcinéia Conceição, Helena Becker, Belmino Romero, Odair Pastor, Francisco Gomes, Marco Antônio, Sasaki, Maria das Graças, Eliezer Abdala, Regina Pereira.

Agradecemos também aos nossos colegas de grupo, que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este livro saísse: Allen, André Henrique, Cícero, Clérton, Fátima Itana, Fernando Pedro, Lídia Pantoja, Jefferson, Jhonyson, Juliene, Aparecida, Pablo, No-

nato, Renata, Rouse, Sarah, Thiago, Vicente, Vitor, Edmilson, Kátia, Thalles, Maisa, Daniel, Raquel, Ana Thaís, Yalle, Jayane, Taís e Leila, e a todos aqueles que um dia já foram da Família LAT, o nosso muito obrigado!

Agradecemos ainda à turma dos laboratórios parceiros: Lanágua, Labosan, Labcaju-Nutec, Padetec.

Por fim, queremos agradecer aos nossos familiares pela paciência, amor, dedicação e cuidados: Técia, Maria Técia e Antônio Lucas; Camila e Maria Júlia, Maria Alves, Vicente de Paula, Lúcia de Andrade, Rômulo Andrade, Suellen Sales, Fátima Itana, Marcelo Barbosa, Liduína Barbosa, Arimatéia Barbosa.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| PRINCÍPIOS BÁSICOS | 13 |
| Classificação da cromatografia gasosa | 15 |
| Classificação da cromatografia gasosa quanto à fase estacionária | 15 |
| Classificação da cromatografia gasosa quanto à velocidade de análise - <i>speed enhancement factor (SEF)</i> | 15 |
| Classificação da cromatografia gasosa quanto ao tipo de coluna | 16 |
| Sistema de análise por cromatografia gasosa | 16 |
| Gás de arraste e instrumentação básica | 17 |
| Gás de arraste | 18 |
| Sistema amostrador-injetor..... | 21 |
| Coluna..... | 21 |
| Forno..... | 21 |
| Detectores | 21 |
| Sistema de aquisição de dados..... | 22 |
| Definições básicas em cromatografia | 22 |
| Tempo de retenção..... | 22 |
| Constante de distribuição..... | 23 |
| Fator de retenção..... | 24 |
| Retenção relativa | 25 |
| Volume de retenção..... | 26 |
| Número de pratos teóricos (N) | 26 |
| Resolução..... | 28 |
| Velocidade do soluto e velocidade linear média do gás de arraste..... | 29 |
| Referências bibliográficas | 30 |

| | |
|---|-----|
| MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA EM CROMATOGRAFIA GASOSA | 33 |
| Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction – SPE</i>) | 35 |
| Extração por dispersão da matriz em fase sólida (<i>matrix solid phase extraction – MSPD</i>) | 44 |
| Microextração em fase sólida (<i>solid phase micro extraction – SPME</i>) | 46 |
| Método QuEChERS | 59 |
| Referências bibliográficas | 69 |
| SISTEMA DE INJEÇÃO | 75 |
| Escolha do solvente..... | 76 |
| Propriedades do analito | 77 |
| Tipos de seringa | 79 |
| Temperatura do injetor | 80 |
| Septo..... | 82 |
| Anel de vedação O-ring..... | 85 |
| Bloco metálico | 86 |
| Modo de injeção | 86 |
| Câmara de vaporização (<i>liner</i>)..... | 99 |
| Referências bibliográficas | 104 |
| FASES ESTACIONÁRIAS E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS | 111 |
| Colunas recheadas | 113 |
| Colunas capilares..... | 114 |
| Tipos de fases estacionárias | 117 |
| Escolha da coluna | 128 |
| Programação de temperatura | 130 |
| Equação de Golay e eficiência de coluna capilar em CG | 132 |
| Otimização da velocidade linear da fase móvel e a eficiência da coluna | 146 |
| Cromatografia bidimensional..... | 152 |
| Referências bibliográficas | 155 |
| DETECTORES | 159 |
| Detector de ionização em chama | 160 |

| | |
|---|-----|
| Detector de captura de elétrons | 165 |
| Detector de nitrogênio-fósforo | 169 |
| Detector de condutividade térmica | 172 |
| Detector fotométrico de chama | 175 |
| Detector de fotoionização | 176 |
| Detector de massas | 178 |
| Detector de ionização de descarga de barreira dielétrica – BID | 195 |
| Referências bibliográficas | 198 |
| | |
| VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS | |
| EM CROMATOGRAFIA GASOSA | 203 |
| Validação de métodos analíticos e sua importância | 203 |
| O processo de validação | 207 |
| Parâmetros de validação de um método | 216 |
| Seletividade | 217 |
| Linearidade/faixa de trabalho | 228 |
| Limite de detecção (LD) | 237 |
| Limite de quantificação (LQ) | 241 |
| Exatidão..... | 243 |
| Precisão..... | 250 |
| Robustez..... | 257 |
| Incerteza da medição | 260 |
| Referências bibliográficas | 265 |
| | |
| ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA | 269 |
| Análise qualitativa | 270 |
| Tempo de retenção..... | 271 |
| Índices de retenção..... | 273 |
| Identificação de compostos usando métodos analíticos auxiliares | 283 |
| Análise quantitativa | 284 |
| Técnicas de integração de pico | 285 |
| Métodos de quantificação..... | 289 |
| <i>Método de normalização</i> | 290 |
| <i>Método do padrão externo</i> | 295 |
| <i>Método da superposição de matriz</i> | 301 |

| | |
|--|-----|
| <i>Método do padrão interno</i> | 305 |
| <i>Método do padrão interno múltiplo</i> | 310 |
| <i>Método da adição de padrão</i> | 314 |
| Análise comparativa dos diferentes métodos de quantificação..... | 324 |
| Referências bibliográficas | 326 |
| OS AUTORES | 329 |

PRINCÍPIOS BÁSICOS

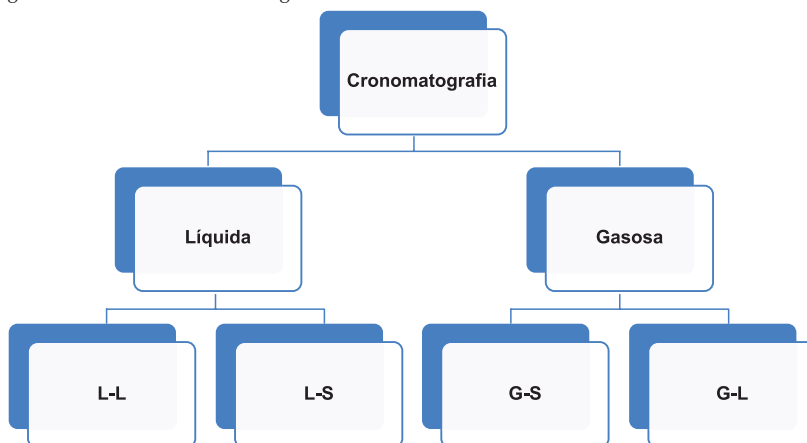
Ari Clecius Alves de Lima
Ronaldo Ferreira do Nascimento
Pablo Gordiano Alexandre Barbosa
Vítor Paulo Andrade da Silva

A cromatografia é, antes de tudo, um método físico-químico de análise largamente empregado tanto na separação de compostos químicos como na identificação (**análise qualitativa**) e quantificação (**análise quantitativa**) das espécies separadas. A palavra cromatografia é derivada das palavras gregas **χρόμα: chroma**, que significa cor, e **γραφειν: grafein**, que significa escrita. A cromatografia é uma técnica de separação que, quando acoplada a técnicas hifenadas, torna-se uma ferramenta muito importante na investigação de compostos químicos. De acordo com a Iupac, é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel, que se move em uma direção definida. Técnicas de separação cromatográficas são conhecidas há séculos, entretanto o primeiro a utilizar o termo foi o botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett, em 1901, com a separação de clorofilas e xantofila em uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio (TSWETT, 1906).

O trabalho de Tswett passou a ter destaque apenas em 1930, com novos trabalhos de separação de pigmentos de plantas através de cromatografia em papel. Nesse período, vários outros trabalhos foram escritos na área de cromatografia em papel e cromatografia de camada delgada. A partir de 1940, foi desenvolvida a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de partição e coluna (MARTIN, 1941). Iniciaram-se também os estudos de adsorção cromatográfica de gases. A adsorção de gases e a cromatografia de partição gás-líquido tiveram grande desenvolvimento na década de 50, e, a partir da década de 60, a cromatografia teve um rápido desenvolvimento nas áreas química, biológica, médica, farmacêutica e em estudos ambientais e de controle de qualidade. Passou a ser usada também, em escala preparativa, em processos de produção, análise de traços de poluentes para monitoramento ambiental e estudos de toxicidade.

A cromatografia só passou a ter destaque a partir da década de 50, com os trabalhos de Synger e Martin pela invenção da cromatografia de partição, em 1952 (JAIME; MARTIN, 1952). O desenvolvimento de colunas de sílica fundida foi que proporcionou os maiores avanços em cromatografia gasosa de alta resolução no campo de análise de compostos orgânicos (BARTLE, 2002). Contudo, a cromatografia gasosa só teve realmente um desenvolvimento significativo a partir do ano de 1970. A cromatografia pode ser dividida em líquida, em que a fase móvel é um líquido, e gasosa (Figura 1.1), em que a fase móvel é um gás. Os principais mecanismos de separação para ambas as modalidades são por partição e por adsorção. O sistema de partição ocorre na interface entre dois fluidos, e o mecanismo de adsorção, em um sistema fluido-sólido:

Figura 1.1 - Divisão da cromatografia



Fonte: Elaborada pelos autores.

Classificação da cromatografia gasosa

Classificação da cromatografia gasosa quanto à fase estacionária

A cromatografia gasosa é um processo de separação em que a fase móvel é um gás, e a fase estacionária é um sólido (cromatografia gás-sólido) ou um líquido (cromatografia gás-líquido). Na cromatografia gás-líquido, temos um gás passando por uma coluna com um líquido de alta viscosidade revestindo as suas paredes internas.

Classificação da cromatografia gasosa quanto à velocidade de análise - *speed enhancement factor* (SEF)

A cromatografia gasosa pode ser classificada quanto à velocidade em cromatografia rápida (*Fast-GC*), SEF de 5-30; muito rápida (*very fast-GC*), SEF de 30-400; ultrarrápida (*ultrafast-GC*), SEF de 400-4000 (DAGAN; AMIRAV, 1996; SEQUINEL et al., 2010).

Classificação da cromatografia gasosa quanto ao tipo de coluna

A cromatografia gasosa pode ser classificada ainda como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença principal entre CG e CGAR é que colunas de CGAR são maiores em comprimento e menores em diâmetro, possuem a fase líquida como um filme aplicado diretamente às paredes do tubo da coluna (colunas capilares) e são mais eficientes. As colunas em CG são colunas empacotadas e de maior diâmetro (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Sistema de análise por cromatografia gasosa

Gases ou substâncias orgânicas voláteis podem ser separados utilizando-se a técnica da cromatografia gasosa. A separação baseia-se na diferente distribuição de substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel, em que um gás quimicamente inerte, chamado gás de arraste, tem a função de eluir da coluna (fase estacionária) os componentes constituintes da mistura. Os compostos introduzidos na coluna que não têm muita interação com a fase estacionária são primeiramente eluídos pelo gás de arraste até o detector, sendo eluídos, em seguida, os que têm mais afinidade com a fase estacionária. A análise é rápida, podendo ser efetuada em minutos. Entretanto, na maioria das vezes, há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna cromatográfica (BARTLE, 2002).

A CGAR é uma técnica que possui um poder de resolução excelente, tornando possível a análise e identificação de dezenas de substâncias. A resolução depende, dentre outros fatores, da eficiência e da seletividade da coluna. A eficiência, por sua vez, relaciona-se com o número de pratos teóricos da coluna cromatográfica.

O conhecimento não só da técnica em si, mas da teoria cromatográfica, é de elevada importância, principalmente quanto aos as-

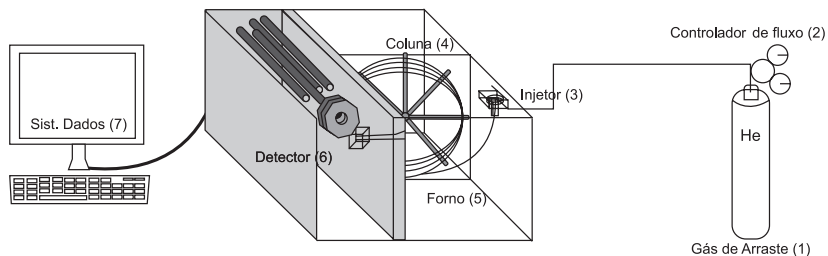
pectos de interpretação dos cromatogramas, de escolha e manutenção da coluna, sobretudo esta última. A escolha correta da coluna, baseada na teoria cromatográfica, evita o tradicional empirismo experimental empregado pela maioria dos usuários desta técnica, o qual acarreta em perda de tempo, consumo de reagentes e desgaste de equipamentos caros, bem como desgaste do próprio cromatografista (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O *know-how* das noções básicas dos parâmetros instrumentais e experimentais permite ao cromatografista planejar com sucesso uma análise cromatográfica, ou seja, possibilita a otimização dos parâmetros separação e tempo de corrida. Esses termos estão relacionados com o tempo de retenção, volume de retenção, retenção relativa (seletividade), eficiência da coluna e resolução.

Gás de arraste e instrumentação básica

Apesar de os componentes do sistema de instrumentação terem evoluído nos últimos anos, a técnica tem como principais componentes: o sistema de introdução do gás de arraste (1), controlador de fluxo (2), sistema amostrador-injetor (3), coluna (4), forno (5), detector (6) e sistema de aquisição de dados (7) (Figura 1.2).

Figura 1.2 - Partes componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso



Fonte: Elaborada pelos autores.

Gás de arraste

O objetivo principal do gás de arraste é transportar a amostra através da fase estacionária sem alterar sua estrutura e conduzi-la ao detector com o mínimo de interferência possível. Devido a estes requisitos, o gás de arraste deve ser de alta pureza, inerte e deve ser adequado ao tipo de detector. Os principais gases de arraste são He, N₂ e H₂. De acordo com o tipo de detector utilizado, alguns interferentes podem surgir por escolha inadequada do gás (Tabela 1.1).

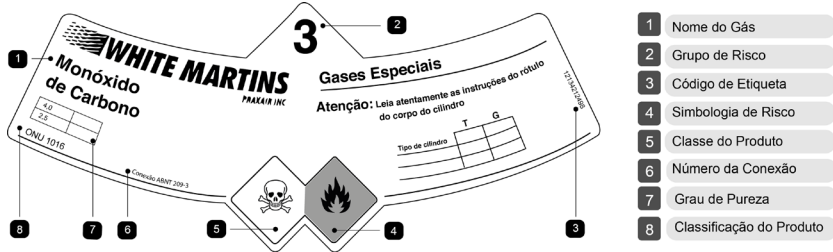
Tabela 1.1 - Especificação do gás de arraste para o tipo de detector e a interferência na qualidade da análise em caso de gases não apropriados

| Gás de arraste | Detector | Interferência em caso de gás não apropriado |
|---|---|--|
| He, N ₂ , H ₂ (Grau analítico ou 5.0) | Detector de ionização em chamas (FID) | Hidrocarbonetos causam ruído de fundo e reduzem a sensibilidade do detector |
| He, N ₂ , H ₂ (Grau analítico ou 5.0) | Detector de condutividade térmica (TCD) | Umidade e oxigênio oxidam os filamentos, podendo ocorrer picos negativos e a redução da sensibilidade |
| He, N ₂ (Grau ECD) | Detector de captura de elétrons (DCE) | Umidade e oxigênio reduzem a resposta do detector e a vida da coluna |
| He, N ₂ (Grau analítico ou 5.0) | Detector de espectrometria de massa (DEM) | Imprecisões analíticas podem resultar de qualquer tipo de impureza que coincida com os picos quantificados |

Fonte: White Martins (2014).

A segurança e o conhecimento das propriedades dos gases são importantes. Todo cilindro apresenta uma etiqueta de identificação (Figura 1.3), por exemplo, o grau de pureza em um cilindro de Ar Sintético 5.0 FID significa pureza de 99,999%, usando-se conexões de acordo com a norma ABNT 262-1:

Figura 1.3 - Identificação do gás



Fonte: White Martins (2014).

Sempre após a instalação do cilindro, devem ser verificados vazamentos nas válvulas e conexões. Além disso, nunca devem ser armazenados próximos os cilindros de gases combustíveis e os de gases oxidantes. Os cilindros devem ser mantidos em local seco e arejado, longe de fontes de calor. Também não se deve fumar próximo aos ambientes de armazenamento.

Reguladores de pressão

Os reguladores de pressão são importantes no controle de abastecimento dos gases de arraste (Figura 1.4). Reguladores mal instalados ou desgastados podem apresentar vazamentos, ocasionando perda de gás.

Figura 1.4 - Regulador de pressão



Fonte: White Martins (2014).

Controlador de fluxo

A medição e controle do gás de arraste são importantes para a reprodutibilidade dos resultados. Cromatógrafos atuais já possuem um sistema avançado de controle de fluxo que permite realizar esse controle. O controle e aferição podem ser realizados com fluxômetros de bolha, mais conhecidos como bolhômetros, ou medidores de fluxos eletrônicos. Os dois são fáceis de operar (Figura 1.5).

Figura 1.5 - Medidor de fluxo digital e bolhometro



Fonte: G-CROM [200-].

Sistema amostrador-injetor

O sistema amostrador-injetor é composto de vários itens que integram o sistema de injeção: seringa de injeção, septo, *inlet liner*. O sistema de injeção pode ser automático ou manual. Novos sistemas de injeção com controladores de temperatura do tipo rampa ou acoplamento de fornos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos para amostragem de sólidos.

Coluna

A coluna deve ser escolhida de acordo com as propriedades do analito a ser analisado: polaridade, peso molecular, volatilidade, quantidade de analitos na amostra.

Forno

A coluna fica localizada no forno, e um bom controle de temperatura é essencial para a separação. O forno tem que ser robusto e ao mesmo tempo sensível para manter a temperatura programada e permitir um rápido aquecimento e resfriamento.

Detectores

Os detectores são escolhidos de acordo com o analito que será analisado. Para muitos casos, é requerido um detector seletivo que responda a uma determinada classe de compostos com propriedades físicas e químicas comuns, entre os quais temos o detector de ionização em chama (DIC ou FID - *flame ionization detector*) e o detector de captura de elétrons (DCE ou ECD - *electron capture detector*). Outras vezes, podemos usar um detector universal, como o detector de condutividade térmica (DCT ou TCD - *thermal conductivity detector*) ou o detector por espectrometria de massa (DEM ou MS - *mass spectrometer*). Escolher um detector seletivo é uma boa

opção para análises industriais específicas, entretanto, para análises em pesquisa, um detector universal é mais útil devido à possibilidade de analisar uma diversidade maior de compostos.

Sistema de aquisição de dados

A maioria dos cromatógrafos atualmente já vem com um sistema de aquisição de dados em que é possível, além do registro, fazer uma auditoria no sistema de aquisição. Entretanto, ainda se usam alguns outros métodos de aquisição de dados, como registro em papel.

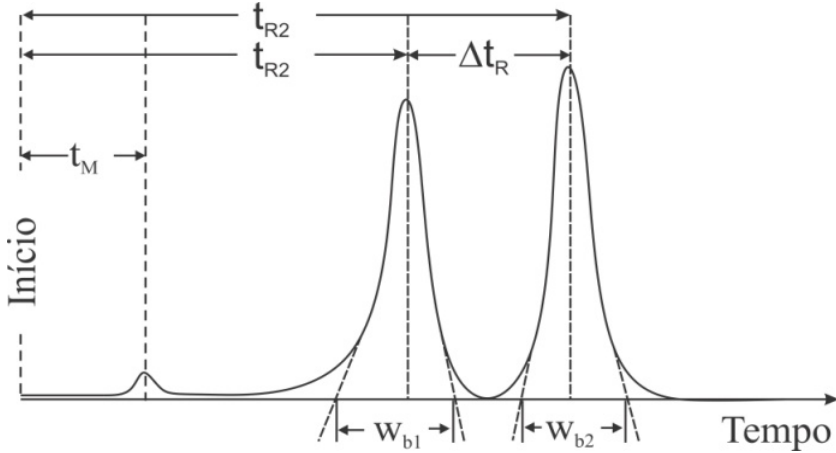
Definições básicas em cromatografia

Tempo de retenção

O tempo de retenção (t_R) é o tempo decorrido desde o momento da injeção da amostra até que se tenha obtido o máximo do pico. Esse tempo é característico do soluto, da fase líquida do fluxo do gás de arraste e da temperatura da coluna. O tempo de retenção e a posição do máximo do pico irão mudar se ocorrer qualquer modificação nas condições de operação. Portanto, mantendo-se as mesmas condições de análise, o pico será sempre obtido no mesmo tempo de retenção. Logo, esse fato nos permite utilizar os tempos de retenção para a identificação dos picos, a qual pode ser feita mediante a comparação do tempo ou do volume de retenção de um padrão com a amostra. Porém, isso não é conclusivo porque dois compostos podem sair no mesmo tempo de retenção em determinadas condições de análise. Na Figura 1.6, é mostrado um cromatograma em que cada pico representa um composto, cada um em um tempo de retenção específico (t_r). O tempo corrigido (t'_r) é calculado em função do tempo morto (t_m), tempo que o soluto leva para transitar pelo espaço vazio da coluna, o qual pode ser calculado pelo tempo em que um composto não retido sai da coluna. Pode-se usar metano ou ar para determinar o

tempo morto. É importante lembrar que essa opção só funciona se o metano ou o ar (N_2/O_2) não tiverem interação com a coluna.

Figura 1.6 - Cromatograma com a linha de base, largura e tempo de retenção corrigido



Fonte: Elaborada pelos autores.

Constante de distribuição

A constante de distribuição é uma constante de equilíbrio termodinâmico. É um fator de partição entra a fase estacionária e a fase móvel e pode representar o quão rápido o soluto se move através da coluna. Para um dado soluto A, podemos determiná-la pela Equação 1.1:

$$K_C = \frac{[A]_s}{[A]_M} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Em que:

K_C = constante de distribuição;

A = concentração do soluto;

S e M referem-se às fases estacionária e móvel, respectivamente.

O valor de K_C aumenta com a afinidade com a fase estacionária; longos valores de K_C levam a longos tempos de retenção; compostos não retidos têm coeficiente de distribuição igual a zero.

Fator de retenção

Também chamado de razão de partição ou fator de capacidade, é uma medida de tempo de residência do componente da amostra na fase estacionária. O fator de retenção é a relação entre o tempo que o composto gasta na fase estacionária e o tempo que o composto gasta na fase móvel (Equação 1.2):

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (\text{Eq. 1.2})$$

k pode ser relacionado à constante de distribuição pela Equação 1.3:

$$K_C = k * \beta \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Em que:

β = razão de fase, isto é, é um valor adimensional que relaciona o diâmetro da coluna e a espessura do filme da coluna, sendo utilizado para determinar a influência destes na retenção dos compostos (Equação 1.4):

$$\beta = \frac{d}{4d_f} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

Em que:

d = diâmetro da coluna;

d_f = espessura do filme.

Retenção relativa

O fator de separação α , também conhecido como seletividade, é a relação existente entre o tempo que dois picos permanecem na fase líquida, sendo proporcional aos coeficientes de partição. É sempre maior que 1 (Equação 1.5):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

Em que:

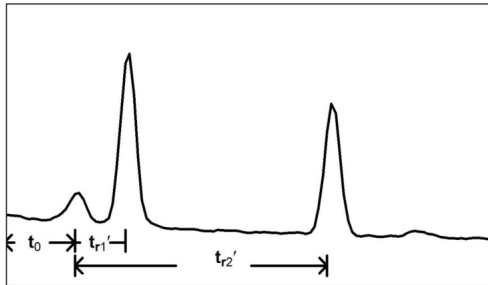
t'_r = tempo de retenção relativa, podendo ser calculado por $t_r - t_m$;

t_r = tempo de retenção;

t_m = tempo de um composto não retido (tempo morto).

O estudo da retenção relativa nos dá informações acerca da seletividade da fase estacionária com relação a dois componentes. Quando α for igual à unidade ($\alpha=1$), significa que os dois componentes terão a mesma solubilidade nessa fase estacionária. Assim, esses componentes não poderão ser separados por essa fase. Quanto maior for o valor de α , mais seletiva será a fase líquida, e, portanto, uma melhor separação será alcançada (Figura 1.7).

Figura 1.7 - Cromatograma ilustrando o cálculo da seletividade da coluna



Fonte: Elaborada pelos autores.

O melhor método, usando dados de retenção, compara o tempo de retenção ajustado da amostra em relação a um padrão. Esse método, chamado de retenção relativa, é de fácil obtenção e depende apenas da temperatura da coluna e do tipo de fase estacionária usada.

Volume de retenção

Este é outro parâmetro de relevada importância na posição do pico. O V_R é o volume necessário de gás de arraste para eluir uma amostra da coluna desde o momento da injeção até a eluição do pico. O fluxo (F_C) é mantido constante durante toda a eluição, o que possibilita converter o tempo de retenção em volume de retenção, apenas multiplicando-se t_R pelo fluxo da coluna, ou seja:

$$V_r = t_r * F_C \quad (\text{Eq. 1.6})$$

O volume de retenção de qualquer pico inclui o volume morto da coluna, uma vez que todas as amostras necessitam passar pela coluna para sofrer a separação. Portanto, o volume de retenção de uma amostra A, por exemplo, o qual é característico de A, não será V_r , mas V_r menos o volume morto, V_m . Esse volume, denominado volume ajustado, V_r' , representa o volume do gás de arraste que flui enquanto a amostra A permanece imóvel na coluna (Equação 1.7).

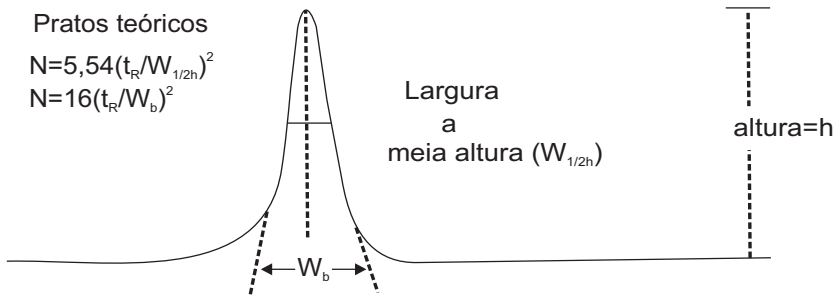
$$V_r' = V_r - V_m = t_r * F_C \quad (\text{Eq. 1.7})$$

Número de pratos teóricos (N)

O número de pratos teóricos é uma medida de eficiência da coluna. Um prato teórico é definido como a distância média que um elemento fluido do analito viaja em uma distribuição ou partição da fase móvel na fase estacionária.

Um prato teórico corresponde a uma etapa de equilíbrio da substância entre a fase estacionária e a fase móvel; portanto, quanto maior o número de pratos teóricos, maior será a eficiência da coluna (picos mais estreitos), ou seja, melhor sua capacidade de separação. Na Figura 1.8, pode ser observado o procedimento para o cálculo de N .

Figura 1.8 - Cromatograma ilustrando o cálculo do número de pratos teóricos (n) de uma coluna



Fonte: Elaborada pelos autores.

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 = 16\left(\frac{t_r}{w_b}\right)^2 = 5,54\left(\frac{t_r}{w_h}\right)^2 \quad (\text{Eq. 1.8})$$

Em que:

N = eficiência da coluna;

t_r = tempo de retenção do pico;

σ = desvio padrão do pico.

Diversos são os fatores que afetam o número de pratos teóricos, tais como o comprimento e o diâmetro interno da coluna, a temperatura, a vazão da fase móvel, o volume da amostra, a técnica de injeção, as características das substâncias etc. O número de pratos e o tempo de retenção são diretamente proporcionais ao comprimento da coluna. Como o número de pratos é baseado no

comprimento, uma forma de expressar a altura de pratos é pela razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos (N):

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Eq. 1.9})$$

Resolução

Resolução é outra medida de eficiência da coluna. É a medida quantitativa de separação de dois picos adjacentes. Idealmente, dois picos com resolução 1,5 são considerados bem resolvidos.

$$R = \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2} \right) \quad (\text{Eq. 1.10})$$

Em que:

R = grau de separação entre dois picos adjacentes;

t_{r2} = tempo de retenção do pico 2;

t_{r1} = tempo de retenção do pico 1;

w_1 = largura da base do pico 1;

w_2 = largura da base do pico 2.

Em uma separação isotérmica, o número de pratos teóricos e o tempo de retenção do analito são diretamente proporcionais ao comprimento da coluna. Se o comprimento da coluna dobrar, o número de pratos teóricos e o tempo de retenção também irão dobrar, entretanto a resolução é proporcional à raiz quadrada do comprimento. Esta relação é válida apenas para separação isotérmica.

$t_{r2} - t_{r1}$ é uma medida da separação dos máximos dos picos, a qual pode ser aumentada quando se reduz a temperatura ou escolhendo-se uma fase mais seletiva (maior α); w_b (denominador) está relacionado à eficiência da coluna e à velocidade de alargamento da banda. Portanto, pode ser medido pelo número de pratos teóricos (N).

Além de N e α , a resolução depende da posição relativa dos dois picos no cromatograma (Figura 1.7). Então, quanto maior a resolução, maior a separação entre dois picos. A equação geral abaixo, denominada equação de resolução, ilustra tal dependência:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{k}{1+k}\right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \quad (\text{Eq. 1.11})$$

Em que: o termo $\sqrt{N}/4$ está relacionado à eficiência da coluna, $k/(1+k)$ à retenção e $\alpha - 1/\alpha$ ao tipo de fase estacionária, ou seja, à seletividade.

Velocidade do soluto e velocidade linear média do gás de arraste

A velocidade do soluto pode ser calculada pela razão entre o comprimento da coluna e o tempo de retenção:

$$\mu = \frac{L}{t_R} \quad (\text{Eq. 1.12})$$

Outra importante relação é a velocidade linear média do gás de arraste, que é calculada a partir do comprimento da coluna e do tempo morto, que é o tempo de retenção de um composto não retido.

Os principais modelos para migração do soluto na coluna são os modelos de Van Deemter (1956) e Golay (1958). Golay introduziu a teoria da dispersão em colunas tubulares abertas, derivou a equação de Van Deemter, que é aplicada para colunas empacotadas, para aplicar a colunas capilares. Os modelos de migração serão mais detalhados no quarto capítulo.

Referências bibliográficas

- BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. *Trends Anal. Chem.*, v. 21, p. 547-557, 2002.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. [S.l.]: Unicamp, 2006.
- DAGAN, S.; AMIRAV, A. Fast, very fast, and ultra-fast gas chromatography-mass spectrometry of thermally labile steroids, carbamates, and drugs in supersonic molecular beams. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 7, p. 737-752, 1996.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, maio 1998.
- FLUXIMETRO digital: ADM 1000. [200-]. Disponível em: <<http://www.gcrom.com.br/fluximetro.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2015.
- GOLAY, M. J. E. Gas chromatography. In: COATES, V. J.; NOEBELS, H. J.; FAGERSON, I. S. (Ed.). *Gas chromatography (1957 Lansing Symposium)*. New York: Academic Press, 1958. p. 1-13.
- JAIME, A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemistry Journal*, v. 50, n. 5, p. 679-690, mar. 1952.
- LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida moderna*. Campinas: Átomo, 2009.
- MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: 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, 1941.
- PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, São Paulo, v. 3, n. 23, p. 370-379, 1999.

SEQUINEL, R. et al. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, p. 2226-2232, 2010.

TSWETT, M. Physikalisch-chemische studien über das chlorophyll: die adsorptionen. *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft*, v. 24, p. 316-323, 1906.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 5, n. 6, p. 271-289, 1956.

WHITE MARTINS. *Praxair*. Gases especiais e Equipamentos. Disponível em: <<http://catalogs.praxairdirect.com/i/82063-specialty-gases-equipment/6>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA EM CROMATOGRAFIA GASOSA

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

Vítor Paulo Andrade da Silva

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Ari Clecius Alves de Lima

A etapa de preparo de amostra é uma das etapas mais importantes do processo analítico, possuindo grande influência sobre a confiabilidade dos resultados na análise. O preparo da amostra consiste em um conjunto de operações para tratar a amostra na sua forma nativa (amostra original), com a finalidade de se transferir(em) o(s) analito(s) para um ambiente químico mais adequado (amostra analítica) ao instrumento de medição analítica, visando a realizar a identificação e quantificação do analito de forma precisa e exata. Em cromatografia gasosa, o foco do preparo da amostra está na pré-concentração e na remoção, tanto quanto possível, de espécies químicas interferentes. Na Figura 2.1, temos uma representação resumida do processo analítico, com ênfase à etapa de preparo da amostra.

Figura 2.1 - Representação resumida das etapas do processo analítico



Fonte: Elaborada pelos autores.

Dependendo da finalidade da pesquisa, o analista pode se deparar com diferentes situações no que se refere ao estado físico e ao grau de complexidade da amostra, podendo esta encontrar-se no estado sólido, líquido ou gasoso. Por exemplo, o técnico de um laboratório deseja determinar o nível de contaminação por pesticidas em uma determinada localidade rural, onde a utilização desses produtos é comum. Ele poderá analisar o solo dos terrenos vizinhos às plantações, corpos hídricos da região ou o ar, buscando verificar se há resíduos de pesticidas dispersos no ambiente da região avaliada.

Como exposto, observamos que, no campo de análise química, existem diferentes situações com as quais o pesquisador/analista pode se deparar, havendo a necessidade da adoção de estratégias específicas de acordo com o tipo de amostra que se deseja analisar.

Durante a década de 1990, houve o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que possibilitaram maior rapidez da análise, utilizando menores volumes de solventes orgânicos, com maior sensibilidade e para matrizes com baixa concentração dos analitos. Esses métodos figuram-se atualmente como técnicas mais eficien-

tes para extração de um amplo espectro de analitos em diferentes tipos de amostra.

Entre as principais técnicas modernas empregadas na extração de compostos e limpeza da amostra, podemos citar: a extração em fase sólida (*solid phase extraction - SPE*), extração por dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase dispersion - MSPD*), microextração em fase sólida (*solid phase microextraction - SPME*), extração sortiva em barra magnética (*stir bar sorptive extraction - SBSE*), extração com fluidos pressurizados (*pressurized fluid extraction - PLE*) e o método *QuEChERS* e suas variantes (PRESTES et al, 2009; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009). Nas seções seguintes, serão exploradas algumas das principais técnicas de preparo de amostras aplicadas em métodos analíticos baseados em cromatografia gasosa nos dias atuais.

Extração em fase sólida (*solid phase extraction - SPE*)

A extração em fase sólida foi desenvolvida em 1976 para contornar as desvantagens da técnica clássica de extração líquido-líquido. Atualmente, é um método de preparo de amostras popular entre os cromatografistas, sendo aplicado no isolamento e enriquecimento dos analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas, como também na limpeza do extrato final (*clean up*) (DEAN, 2009; JARDIM, 2010). Essa técnica é uma modalidade de extração que envolve a interação dos compostos da amostra com uma fase extratora, que pode ser um adsorvente sólido ou um sorvente. Os analitos são seletivamente adsorvidos/sorvidos na fase extratora, sendo posteriormente eluídos com solvente adequado (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; DEAN, 2009).

A fase extratora é constituída de um composto orgânico que está quimicamente ligado a um suporte de sílica granulada ou que o recobre. Os compostos da fase extratora podem ser apolares ou moderadamente polares, sendo a seleção da fase ideal para o preparo da amostra baseada na polaridade do(s) analito(s). As in-

terações entre os compostos da amostra e a fase extratora podem ocorrer via interações de van der Waals (forças de dispersão), dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio e interações iônicas (troca iônica). Os principais mecanismos envolvidos na extração dos compostos são: *adsorção*, *partição* (fase normal e reversa), *troca iônica* e *exclusão por tamanho* (QUEIROZ; COLINS; JARDIM, 2001; SKOOG et al., 2008; DEAN, 2009).

O sistema utilizado tradicionalmente em SPE constitui-se numa configuração em que a fase extratora está inserida, de forma empacotada, no interior de um pequeno tubo, semelhante a uma seringa, denominando-se cartucho ou coluna. Durante a extração, a amostra líquida é inserida no cartucho, sendo aplicada pressão com uma seringa para forçar a passagem da amostra através da fase extratora. A amostra líquida é inserida sob pressão no topo do cartucho, de forma que as moléculas orgânicas da amostra são extraídas e concentradas na fase extratora. Finalmente, os compostos extraídos são desalojados pela passagem de um solvente, como o metanol, obtendo-se o extrato final com os analitos pré-concentrados para posterior análise cromatográfica (SKOOG et al., 2008; DEAN, 2009).

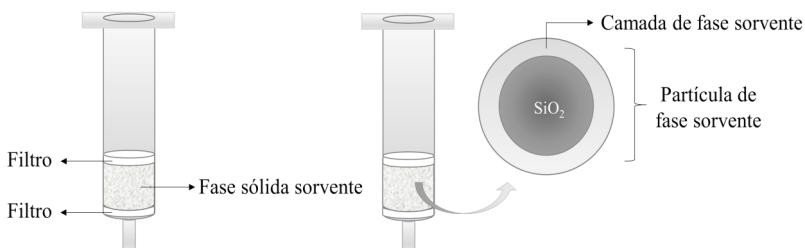
O tubo do cartucho é constituído de polipropileno, com aproximadamente 8,0cm de comprimento (podendo variar), sendo preenchido com cerca de 50 a 500mg do material sorvente, com tamanho de partícula entre 40 e 60 μ m. A fase sólida está localizada entre dois filtros, tipicamente de polietileno, com 20 μ m de diâmetro de poro. Os filtros têm a função de reter material particulado presente na amostra (Figura 2.2) (DEAN, 2009).

Como citado anteriormente, o foco da extração em fase sólida é a eliminação de interferências oriundas da matriz, concentração e isolamento dos analitos oriundos da amostra líquida. O fator de concentração dos analitos no extrato final é baseado na relação entre o volume total de amostra (V_a) eluído através do cartucho e o volume final de extrato (V_{ex}) obtido após eluição com solvente (Equação 2.1) (JARDIM, 2010).

$$f_{CONC.} = \frac{V_a}{V_{ex}} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Por exemplo, se um analista eluir 500ml de amostra e concentrar os analitos extraídos em 1ml de solvente, os compostos serão pré-concentrados em 500 vezes. Tradicionalmente, os analitos podem ser pré-concentrados em fatores entre 100 e 5000 vezes, possibilitando análises qualitativas e quantitativas a nível traço (JARDIM, 2010). O entendimento desse fator é muito importante para estimar corretamente a concentração do analito na amostra original.

Figura 2.2 - Cartucho empregado na extração em fase sólida e partícula de fase sorvente

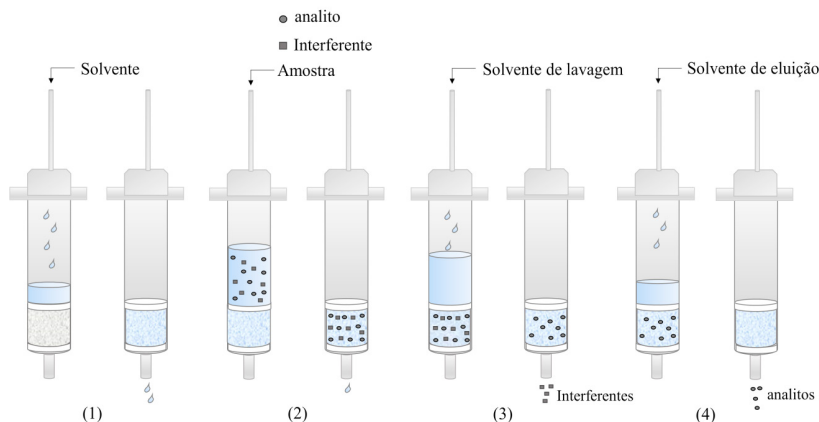


Fonte: Elaborada pelos autores.

Etapas do preparo da amostra via SPE

O procedimento segue basicamente quatro etapas: (1) condicionamento da fase sorvente com solvente adequado; (2) inserção da amostra no cartucho; (3) limpeza do cartucho com solvente (*clean up*) e (4) eluição do(s) analito(s) para obtenção do extrato final. De acordo com as abordagens de operação, podem ocorrer sutis variações nas etapas descritas acima (LANÇAS, 2009; JARDIM, 2010).

Figura 2.3 - Etapas do preparo de amostra via extração em fase sólida (SPE)



Fonte: Elaborada pelos autores.

1. Condicionamento da fase sorvente

Essa etapa é baseada no condicionamento da fase sorvente por meio da passagem de um solvente de eluição adequado, ajustando-se as forças de eluição do solvente de eluição e do solvente da amostra. O condicionamento tem a função de ativar o material da fase sorvente. Esse estágio do procedimento tem importância fundamental para a boa reprodutibilidade da extração, devendo ser conduzida com bastante critério. A seleção do solvente para o condicionamento é baseada na natureza da fase sorvente e da matriz a ser preparada. O solvente a ser utilizado deve possuir características similares ao solvente da amostra.

2. Inserção da amostra

Esse procedimento é tradicionalmente conduzido com o auxílio de uma seringa ou pipeta, com a eluição da amostra através da fase extratora, sendo potencializada pela aplicação de um sistema de vácuo. O volume de amostra pode variar na faixa de litros a microlitros. A introdução da amostra deve ser feita de maneira

lenta, com vazões ajustadas para valores abaixo de 2ml/min, proporcionando extrações reprodutíveis. Em prol da eficiência de extração, é necessária a determinação do volume ótimo de amostra que deve ser processado. O volume ótimo é o volume máximo de amostra que possibilita a maior recuperação possível do(s) analito(s) (extração máxima).

3. Limpeza do cartucho (*clean up*)

Nessa etapa, os possíveis interferentes, extraídos junto com o(s) analito(s), são removidos da fase extratora. Os compostos interferentes são eliminados da fase sólida sorvente aplicando-se um solvente que não possui força de eluição suficiente para extrair o(s) analito(s) do material da fase extratora. Em geral, o solvente adequado para a lavagem da fase sorvente é o próprio solvente da amostra, contanto que ele não remova o(s) analito(s). Tradicionalmente, a solução de eluição possui menor quantidade de solvente orgânico, menor concentração de sais e um pH adequado para potencializar a eluição seletiva dos interferentes.

4. Eluição dos analitos

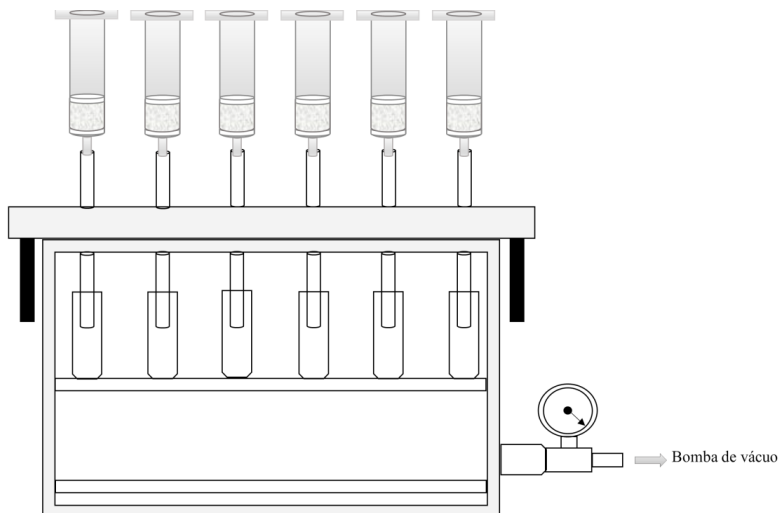
A escolha do solvente de eluição adequado é fundamental para garantir a eluição seletiva do(s) analito(s), não possibilitando a eluição de níveis residuais de interferentes remanescentes da etapa anterior (limpeza/*clean up*). O solvente de eluição do(s) analito(s) deve possuir maior força do que o solvente empregado na eluição dos interferentes. Isso pode ser alcançado com a elevação da quantidade de solvente orgânico, da concentração salina ou com o ajuste do pH da solução de eluição do(s) analito(s). Idealmente, os analitos devem ser eluídos no menor volume possível de solvente para garantir um maior fator de pré-concentração, melhorando a sensibilidade do método.

Aparato empregado em extração em fase sólida

O aparato usado para extração em fase sólida (SPE) pode variar sua constituição, com cada tipo de abordagem possuindo suas vantagens. As principais são relacionadas com o número de amostras que podem ser preparadas simultaneamente, com a natureza da amostra e com o volume que será processado.

Tipicamente, as amostras são processadas utilizando-se instrumento de vácuo multivias *manifold*, que permite o processamento simultâneo de várias amostras, agilizando a análise (Figura 2.4). Contudo, o procedimento também pode ser conduzido sem o *manifold*, processando-se uma amostra de cada vez. De qualquer forma, em ambos os casos, é necessário o uso de bombas de vácuo para potencializar o fluxo de solventes e da amostra através do cartucho (DEAN, 2009; JARDIM, 2010).

Figura 2.4 - Sistema a vácuo multivias *manifold* para SPE



Fonte: Elaborada pelos autores.

Outras abordagens menos comuns também são empregadas, como sistema baseado em discos de extração. Nesse tipo de sistema,

partículas ativas são fixadas em uma matriz inerte de politetrafluoroetileno (PTFE) ou vidro, de maneira que o processo de extração pela fase sorvente ocorre no disco (DEAN, 2009; JARDIM, 2010).

Tipos de fases extratoras em SPE e suas aplicações

A maioria dos materiais sorventes disponíveis consiste de grupos ou cadeias orgânicas quimicamente ligadas em partículas de sílica (SiO_2) (suporte sólido). As partículas de sílica possuem formas irregulares, com diâmetros entre 40 e 60 μm . Os grupos moleculares orgânicos são inseridos nos grupos silanóis (Si-OH), na superfície das partículas de sílica, obtendo-se a fase extratora suportada. A reação de ligação dos grupos orgânicos nem sempre é completa, podendo haver na partícula grupos silanóis remanescentes (DEAN, 2009).

A classificação das fases sorventes é baseada na natureza química dos grupos funcionais da cadeia molecular fixada nas partículas de sílica. Alguns suportes sólidos alternativos como florissil (MgSiO_3), alumina (Al_2O_3) e polímeros macroreticulares podem ser usados no lugar da sílica. Assim como as fases estacionárias em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as fases sorventes são classificadas como fase normal, fase reversa, fase de troca iônica ou fases poliméricas (DEAN, 2009).

As fases sorventes classificadas como fase normal possuem grupos funcionais polares em suas estruturas, como ciano, amino e dióis. Essas fases interagem eficientemente com compostos polares. As fases denominadas de fases reversas possuem grupos funcionais apolares, como octadecil, octil e metil. Essas fases interagem efetivamente com compostos também apolares. As fases de troca iônica possuem grupos carregados eletricamente, interagindo de maneira efetiva com espécies iônicas. Temos como exemplo as fases com grupo ácido sulfônico e as fases com amina terciária e quaternária. Outras fases sorventes são as poliméricas, como o copolímero poliestireno divinilbenzeno e o metacrilato entrecruzado (DEAN, 2009; JARDIM, 2010).

As fases sorventes também podem existir na forma mista, constituindo-se estruturalmente de grupos alquila e grupos trocadores iônicos. Finalmente, temos as fases de polímeros impressos molecularmente, denominadas MIP, e as fases de acesso restrito (RAM), ambas extremamente seletivas (JARDIM, 2010).

Tabela 2.1 (Continua) - Fases sorventes mais comuns empregadas em SPE

| Fase Sorvente | Mecanismo | Aplicação |
|--|-----------------------|--|
| Apolares | | |
| Si - CH ₃ (C1) metil | Partição | Extração de compostos apolares com grupos hidrofóbicos, como grupos alquila e anéis benzênicos. Ex: Drogas, pesticidas, hidrocarbonetos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróis, em amostras de água, fluidos biológicos e efluente. |
| Si - CH ₂ - CH ₃ (C2) etil | Partição | |
| Si - CH ₂ - (CH ₂) ₆ - CH ₃ (C8) octil | Partição | |
| Si - CH ₂ - (CH ₂) ₆ - CH ₃ (C18) octadecil | Partição | |
| Si - CH ₂ - C ₆ H ₅ (fenil) | Partição | |
| Polares | | |
| SiO ₂ (sílica) | Adsorção | Extração de compostos polares com grupos hidroxila, amino, carboxila. Ex: Metabólitos de drogas, fármacos, açúcares, ácidos orgânicos livres, fenóis em amostras de água, fluidos biológicos, efluentes, entre outras. |
| Al ₂ O ₃ (alumina) | Adsorção | |
| MgSiO ₃ | Adsorção | |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CN (cianopropil) | Partição/ Adsorção | |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - NH ₂ (aminopropil) | Partição/ Adsorção | |
| Si - (CH ₂) ₃ - O - CH ₂ - CH(OH) - CH ₂ (OH)(diol) | Partição/ Adsorção | |

Fonte: Adaptada de Queiroz, Collins e Jardim (2001).

O solvente de eluição mais conveniente em aplicações com fases apolares são: metanol, acetonitrila, acetato de etila, clorofórmio, metanol acidificado. Em aplicações com fases polares, são recomendados os solventes: hexano, diclorometano, dentre outros solventes apolares (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Tabela 2.2 - Fases sorventes de troca iônica mais comuns empregadas em SPE

| Fase sorvente | Mecanismo | Aplicações |
|--|-----------------|---|
| Si - CH ₂ - CH ₂ - C ₆ H ₄ - SO ₃ H ⁺ (SCX) benzenossulfonil | Troca catiônica | Analitos com grupos funcionais carregados positivamente, como aminas e piridinas protonadas em matrizes de água, tampões ácidos e fluidos biológicos. |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - SO ₃ Na ⁺ (PRS) sulfonilpropil | Troca catiônica | Analitos com grupos funcionais carregados positivamente, como aminas e piridinas protonadas em matrizes de água, tampões ácidos e fluidos biológicos. |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - COOH carboximetil | Troca catiônica | Analitos com grupos funcionais carregados positivamente, como aminas e piridinas protonadas em matrizes de água, tampões ácidos e fluidos biológicos. |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - N(CH ₂ - CH ₃) ₂ (DEA) dietilamino | Troca aniônica | Analitos com grupos funcionais carregados negativamente como ânions de ácidos orgânicos e fosfatos em água, efluentes e fluidos biológicos. |
| Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - N ⁺ (CH ₃)Cl ⁻ (SAX) trimetilamino | Troca aniônica | Analitos com grupos funcionais carregados negativamente como ânions de ácidos orgânicos e fosfatos em água, efluentes e fluidos biológicos. |

Fonte: Adaptada de Queiroz, Collins e Jardim (2001) e Jardim (2010).

Extração por dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase extraction - MSPD*)

Essa técnica foi desenvolvida por Barker e colaboradores em 1989 (LONG, 1990). Pode ser considerada uma modificação da técnica de extração em fase sólida (SPE) para possibilitar a extração em amostras sólidas, semissecas e viscosas, eliminando muitas das dificuldades associadas com técnicas de isolamento tradicionais (LONG, 1990; SIMPSON, 2000). Ela combina, em uma única etapa, a extração dos analitos e o *clean-up* do extrato, usando um suporte sólido, geralmente contendo uma fase quimicamente ligada. O suporte funciona como um abrasivo para produzir a ruptura na estrutura da amostra, facilitando o processo de extração. Exemplos de fases sólidas empregadas na técnica são o octadecilsilano (C18), octil (C8), florisil e alumina (PINHO; NEVES; QUEIROZ, 2009; LANÇAS, 2010). Percebe-se também que amostras muito viscosas ou contendo partículas relativamente grandes apenas seriam adequadamente trabalhadas na SPE se sofressem diluição, filtração, centrifugação ou algum outro tipo de manipulação. A dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) contorna todos esses problemas. Ela pode ser aplicada na análise de leite, gordura, ovo, carne de aves, gados e peixes, ligante de asfalto, frutas e vegetais, (PINHO; NEVES; QUEIROZ, 2009; SIMPSON, 2000; PINHEIRO et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

A fase sólida ou dispersante possui quatro funções principais durante o preparo da amostra (LONG, 1990):

- Atua como abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da matriz;
- Age como sorvente dos compostos da matriz;
- O material misturado (fase sólida + amostra) pode ser empacotado num cartucho de extração e os analitos podem ser eluídos sequencialmente com um eluente;

- A matriz distribuída na fase sólida produz um único material no interior do cartucho, permitindo um novo grau de fracionamento da amostra.

As etapas do preparo da amostra por DMFS podem ser observadas para melhor entendimento pelo esquema abaixo (Figura 2.5):

Figura 2.5 - Esquema das etapas do preparo de amostra por dispersão da matriz em fase sólida



Fonte: Elaborada pelos autores.

Passo 1: a amostra é homogeneizada diretamente com o suporte sólido, com a ajuda de um almofariz e pistilo. Nessa etapa, poderão ocorrer rupturas da estrutura física da matriz e exposição do analito, para que esse interaja com o suporte sólido. A mistura direta da amostra permite transpor outras etapas de preparo, como: solubilização, centrifugação, filtração etc.

O tamanho de partícula ideal para o material suporte compreende de 40-100 μm , pois não prejudica o fluxo da eluição em relação a partículas menores (3-10 μm) e tem custo mais acessível. A adição de agentes quelantes, ácidos e bases pode afetar o *clean-up* e a eluição dos compostos (DEAN, 2009).

Passo 2: a mistura é inserida no interior de uma coluna provida de um filtro na parte inferior, que pode ser um cartucho de SPE vazio.

Passo 3: a mistura pode ser levemente compactada e arrumada no interior da coluna.

Passo 4: adiciona-se o solvente adequado à separação seletiva do analito que se deseja eluir.

Passo 5: faz-se a coleta da fração eluída contendo os analitos de interesse.

Microextração em fase sólida (*solid phase microextraction - SPME*)

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) é uma técnica que integra amostragem, extração, pré-concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico em uma única etapa e sem o uso de solventes. Foi desenvolvida em 1990 por Janusz Pawliszyn e colaboradores, na Universidade de Waterloo, em Ontário, no Canadá (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990; PAWLISZYN, 1997).

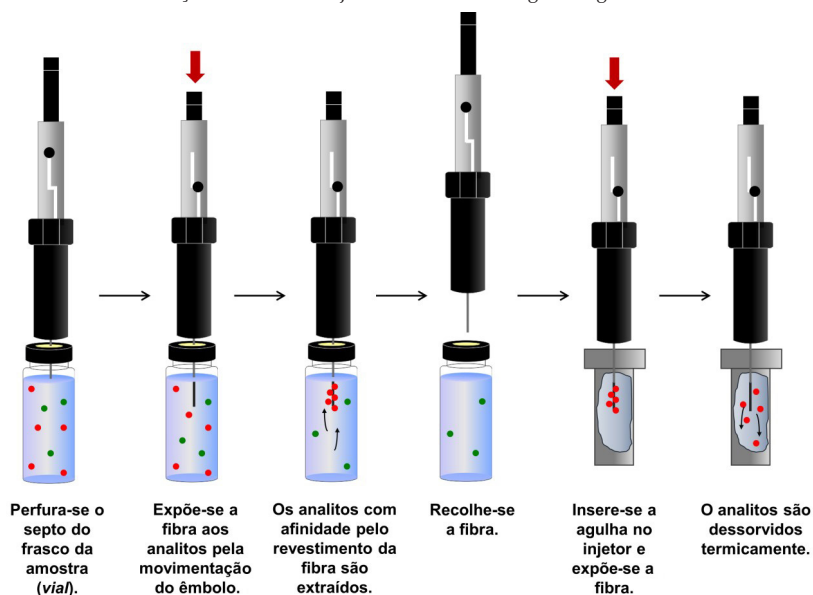
A SPME baseia-se no equilíbrio de analitos entre uma fibra de sílica fundida ou uma fibra recoberta com um polímero não volátil (equilíbrio de adsorção e partição, respectivamente) e a matriz

amostral. A fibra responsável pela extração fica protegida no interior de uma agulha, adaptada em um dispositivo chamado *holder*, sendo exposta pela movimentação de um êmbolo. A altura (comprimento) da agulha pode ser ajustada de acordo com a finalidade ou com o local em que se deseja inseri-la. As fibras podem ser substituídas, caso seja necessário, por motivos de desgaste ou para que se empregue outro tipo de polímero, de acordo com as características físico-químicas do(s) analito(s)-alvo.

No ato da exposição da fibra na matriz da amostra, tende-se a estabelecer um equilíbrio dos analitos entre a matriz da amostra e a fibra. Os analitos sorvidos na fibra são posteriormente dessorvidos termicamente no interior do sistema injetor de um cromatógrafo a gás (SKOOG et al., 2000, BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001) ou em um *loop* apropriado de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Como podemos observar na Figura 2.6, a amostra a ser analisada é confinada em um recipiente chamado de *vial*, cuja tampa possui um septo, geralmente feito de silicone. Em seguida, perfura-se o septo desse frasco com a agulha do *holder*, e pressiona-se o êmbolo, expondo-se a fibra. Os analitos são concentrados no revestimento polimérico da fibra, também chamado de fase estacionária, por meio de um equilíbrio de partição ou adsorção. O que vai determinar o tipo de equilíbrio será a natureza da fase estacionária da fibra. Após um determinado tempo de exposição na amostra, a fibra é retraída, e a agulha, retirada do frasco. Posteriormente, insere-se a agulha do *holder* no injetor do cromatógrafo a gás, e expõe-se a fibra novamente, sendo os analitos dessorvidos em virtude da alta temperatura e conduzidos pelo gás de arraste até a coluna cromatográfica.

Figura 2.6 - Procedimento básico de operação da SPME. Processo de extração dos analitos da amostra e dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo a gás



Fonte: Elaborada pelos autores.

Como a SPME não utiliza solventes, há uma grande redução na geração de descartes e na exposição ocupacional. É uma técnica simples, de fácil manuseio em relação a outras técnicas, e possui a vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas, tais como ambiental, farmacêutica, alimentícia, de aromas, forense e toxicologia (VALENTE; AUGUSTO, 2000; KOMATSU; VAZ, 2004; GUADARRAMA et al., 2001).

Como cada analito possui características físico-químicas particulares, comportando-se de maneira específica em relação ao equilíbrio de partição ou adsorção existente entre a fibra e a matriz da amostra, devem-se buscar as condições de extração cujo equilíbrio favoreça a concentração dos analitos no revesti-

mento polimérico. O primeiro passo é a escolha apropriada da fase estacionária da fibra, que deve possuir afinidade pelo analito, ou pela maioria dos analitos a serem investigados. Essa etapa é determinante no processo de SPME (CALDAS et al., 2011). O segundo passo é otimizar as condições de extração, tais como salinidade do meio, pH, temperatura e tempo de extração.

O efeito da salinidade afeta a força iônica, podendo reduzir ou aumentar a solubilidade do analito na matriz amostral, de acordo com a polaridade do mesmo (CALDAS et al., 2011; HELENO et al., 2010). Dessa forma, torna-se possível potencializar a extração dos analitos pela alteração da força iônica da matriz da amostra.

O pH da amostra afeta o grau de ionização dos analitos, influenciando, conseqüentemente, a sua solubilidade em água e, portanto, a sua partição ou adsorção na fibra. Em alguns casos, o ajuste do pH da amostra é necessário para estabilizar os analitos e aumentar sua retenção na fase estacionária.

A influência da temperatura na partição do analito entre a fase polimérica e a amostra pode ser descrita em termos cinéticos e termodinâmicos. Teoricamente, a quantidade extraída aumenta com a temperatura, devido à melhor transferência de massa (HELENO et al., 2010). Contudo, para processos exotérmicos, o aumento de temperatura diminui o valor do coeficiente de partição entre a fibra e o analito. Portanto, diminuindo-se a temperatura, aumenta-se a quantidade de analito extraída. Existe, assim, uma quantidade máxima extraída que depende da temperatura e das características do sistema de extração (amostra/fibra) (PAWLISZYN, 1997).

O tempo ótimo para a extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. O tempo requerido para o equilíbrio, quando a fibra é exposta na amostra, depende apenas da espessura do filme líquido da fibra e do coeficiente de difusão do analito na fibra extrativa (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2009). Filmes mais espessos propor-

cionam maior quantidade de analito retido na fibra, entretanto, geram maior tempo de extração. A espessura do revestimento da fibra relaciona-se com a quantidade de analito extraído, pois quanto mais espesso for, maior a quantidade de analito extraído. No entanto, são requeridos maiores tempos para atingir-se o equilíbrio de sorção na fibra.

O nível de agitação da amostra é também um parâmetro importante, pois uma agitação eficiente diminui o tempo de extração, tendo em vista sua influência nos processos de transferência de massa entre a fibra e a amostra. Dessa forma, embora a técnica de SPME seja versátil, deve-se otimizar as condições de extração para cada tipo de amostra.

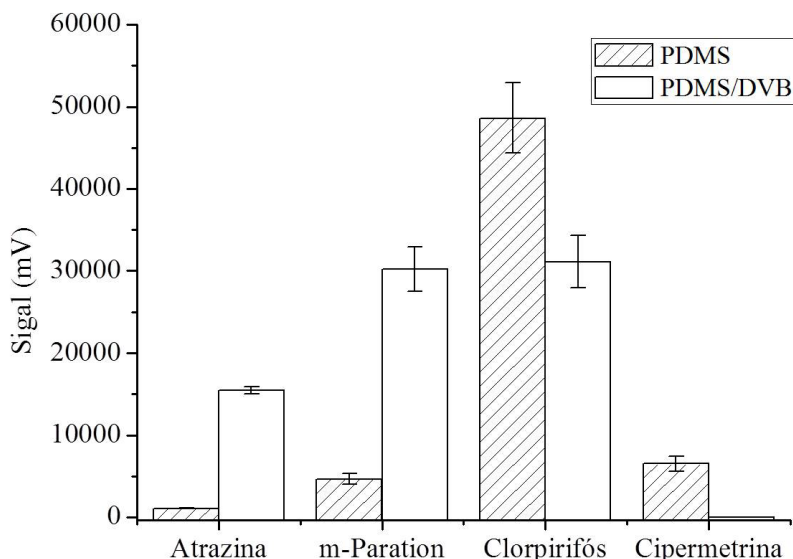
Na partição, o analito é retido no interior do volume do filme polimérico líquido que reveste a fibra (PARREIRA; CARDEAL, 2005). Ou seja, a partição ocorre em tipos de fibras em que o revestimento polimérico tem propriedades de um líquido. Forma-se um equilíbrio de partição entre a fibra e a amostra, baseado na distribuição do analito entre as duas fases líquidas imiscíveis. Esse processo é influenciado, principalmente, pela espessura do filme polimérico e pelo tamanho do analito.

O processo de extração por adsorção ocorre por meio de interações físicas com a superfície do revestimento da fibra. A fase extratora da fibra é composta de um sólido poroso com grande superfície de adsorção. Os analitos ficam retidos dentro dos poros internos do revestimento sólido adsorvente. A quantidade de analitos extraídos é proporcional ao número de sítios de adsorção, de maneira que a relação entre a quantidade de analito extraído e sua concentração na amostra não é linear em altas concentrações (PAWLISZYN, 2000).

Como mencionado anteriormente, a escolha da composição da fase estacionária da fibra é determinante no sucesso do procedimento de SPME, pois é ela que irá interagir e promover a extração dos analitos. Como exemplo, podemos citar o estudo de Silva (2013), que avaliou dois tipos de fibras: PDMS e PDMS-DVB, no processo de extração de quatro pesticidas: atrazina, parationa metílica, clor-

pirifós e cipermetrina. Os resultados das extrações medidos em área de pico são mostrados na Figura 2.7. Pode-se observar que foi possível detectar os quatro pesticidas utilizando a fibra PDMS, que apresentou resultado mais eficiente. A fibra PDMS/DVB demonstrou características de seletividade por ter extraído os pesticidas mais polares.

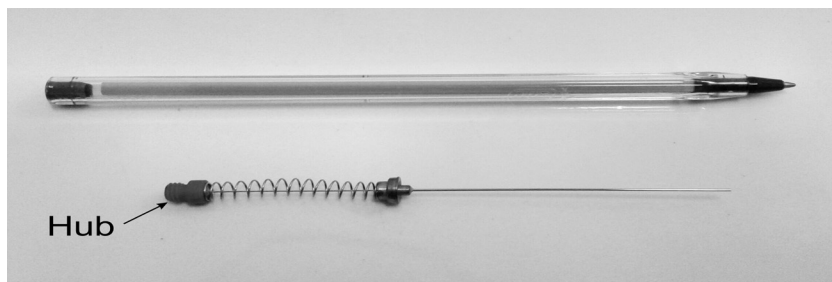
Figura 2.7 - Comparação entre as eficiências de extrações da fibra PDMS e PDMS/DVB



Fonte: Elaborada pelos autores.

Comercialmente, estão disponíveis fibras com revestimentos de polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB-CA-PDMS) e carbowax-templated resin. As fibras mistas, por possuírem característica polares e apolares, simultaneamente, são muito aplicadas em análises em que se deseja aumentar o espectro de analitos a serem determinados. Na Figura 2.8, pode ser observada uma fibra disponível comercialmente.

Figura 2.8 - Conjunto de fibras de SPME. A cor do *hub* identifica o tipo de revestimento de fibra (Foto: Hilton César Rodrigues Magalhães)



Fonte: Elaborada pelos autores.

O material mais comum como revestimento é o polidimetilsiloxano (PDMS). Ambas as fases PDMS e PA extraem as amostras por meio da absorção (partição) dos analitos, que se dissolvem e se difundem para o material do revestimento. Os tipos restantes, carbowax-DVB (CW-DVB), Carbowax-templated resin (CW-TPR), PDMS-Carboxen (PDMS-CAR), extraem os analitos por mecanismos de adsorção. Nessa situação, os analitos permanecem na superfície da fibra, como uma monocamada (MCNAIR; MILLER, 2009). O revestimento PDMS-Carboxen é um caso especial que compreende uma fase de carbono ativo microparticulado (adsorvente Carboxen 1006 com aproximadamente $1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ de área superficial), sendo amplamente aplicado na determinação de gases e compostos voláteis. Outra constatação interessante é o fato de que a quantidade extraída do analito independe do volume da amostra em análise. Assim, a coleta dos analitos pode ser feita diretamente no ambiente natural, expondo a fibra extrativa ao sistema em estudo, como a atmosfera, a água de um rio ou efluentes industriais (PAWLISZYN, 1997; VALENTE; AUGUSTO, 1999; VAS; VÉKEY, 2004). Na Tabela 2.3, estão resumidas as fibras disponíveis no comércio, com as principais características.

Tabela 2.3 - Resumo das fibras disponíveis comercialmente

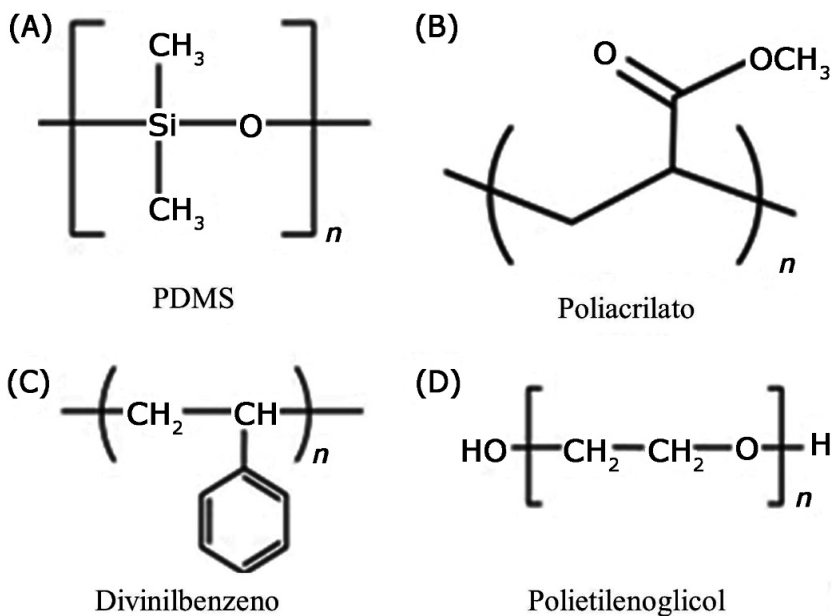
| Revestimento da fibra | Espessura do filme (m) | Polaridade / Tipo de interação | Método de cobertura | Temperatura máxima de operação (°C) | Técnica |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| PDMS | 100 | Apolar/adsorção | Não ligada | 280 | GC/ HPLC |
| PDMS | 30 | Apolar/adsorção | Não ligada | 280 | GC/ HPLC |
| PDMS | 7 | Apolar/adsorção | Ligada | 340 | GC/ HPLC |
| PDMS-DVB | 65 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 270 | GC |
| PDMS-DVB | 60 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 270 | HPLC |
| PDMS-DVB ^a | 65 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 270 | GC |
| PA | 85 | Polar/adsorção | Ligação cruzada | 320 | GC/ HPLC |
| Carboxen-PDMS | 75 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 320 | GC |
| Carboxen-PDMS ^a | 85 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 320 | GC |
| Carbowax-DVB | 65 | Polar/adsorção | Ligação cruzada | 265 | GC |
| Carbowax-DVB ^a | 70 | Polar/adsorção | Ligação cruzada | 265 | GC |
| Carbowax-templated resina | 50 | Polar/adsorção | Ligação cruzada | 240 | HPLC |
| DVB-PDMS-Carboxen ^a | 50/30 | Bipolar/adsorção | Ligação cruzada | 270 | GC |

Fonte: Mills e Walker (2000).

a: Tipo stabeflex com fibra de 2cm de comprimento.

Na Figura 2.9 abaixo, podem ser observadas algumas unidades de monômeros para os diferentes tipos de recobrimento que uma fibra pode ter.

Figura 2.9 - Representações das estruturas moleculares das principais fibras para SPME



Fonte: Elaborada pelos autores.

O índice de polaridade das fibras diminui no sentido CW-TPR > CW-DVB > PDMS-DVB > PA > DVB-CAR-PDMS > CAR-PDMS > PDMS (KATAOKA, 2000). Na Tabela 2.4, estão relacionados os tipos de fibras recomendadas de acordo com os analitos a serem analisados.

Tabela 2.4 - Seleção da fibra e tipo de aplicação

| Tipo de analito | Fibra recomendada |
|--|--|
| Gases e compostos de baixo peso molecular (MM 30-225) | Carboxen/polidimetilsiloxano 75µm/85µm |
| Voláteis (MM 60-275) | Polidimetilsiloxano 100µm |
| Voláteis, aminas e compostos nitroaromáticos (MM 50-300) | Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno 65µm |
| Semivoláteis polares (MM 80-300) | Poliacrilato 85µm |
| Compostos apolares de alto peso molecular (MM 125-600) | Polidimetilsiloxano 7µm |
| Apolares e semivoláteis (MM 80-500) | Polidimetilsiloxano 30µm |
| Álcoois e compostos polares (MM 40-275) | Polietilenoglicol (PEG) 60µm |
| Aromas (flavor): voláteis e semivoláteis, C3-C20 (MM 40-275) | Divinilbenzeno/Carboxen polidimetilsiloxano em uma fibra StableFlex 50/30µm |
| Análise de traços de compostos (MM 40-275) | Divinilbenzeno/Carboxen em polidimetilsiloxano em uma fibra StableFlex 2cm 50/30µm |
| Aminas e compostos polares (somente HPLC) | Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno 60µm |

Fonte: Sigma-Aldrich (2014).

MM = massa molar em g/mol

O termo “fase quimicamente ligada” refere-se aos revestimentos poliméricos que estão ligados quimicamente ao suporte, nesse caso, à fibra de sílica fundida. O objetivo principal é unir, em um só material, as propriedades químicas dos grupos orgânicos com a rigidez e estabilidade térmica e hidrolítica do suporte (TONHI et al., 2002).

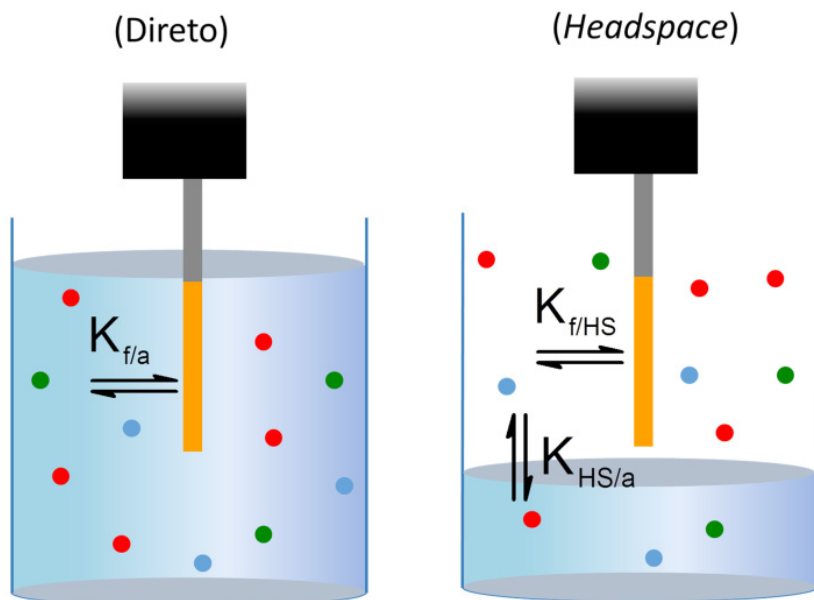
Nas fibras baseadas em polímeros de ligação cruzada, as ligações são formadas entre as cadeias poliméricas, fazendo com que o polímero fique mais firme e estável, perdendo sua fluidez. Nesse tipo de fibra, emprega-se também o termo *reticulação*, de maneira que, quanto mais intensa a reticulação, mais rígida será a estrutura molecular do polímero. Essas ligações

covalentes entre as moléculas lineares produzem polímeros tridimensionais com alta massa molar (STEVENS, 1999; NICHOLSON, 2006).

Extração por *headspace*

A determinação de compostos semivoláteis, voláteis e gases pode ser feita também apenas expondo a fibra na fase de vapor da amostra. Esse procedimento, também utilizado em SPME, é chamado de extração por *headspace*. Na Figura 2.10, mostra-se um esquema de como ocorre a extração por *headspace*, em que o analito se distribui entre a fase aquosa e gasosa, e entre a fase gasosa e a fibra.

Figura 2.10 - Esquema de SPME por modo direto e por *headspace*



Fonte: Elaborada pelos autores.

Caso seja conveniente, a fibra pode apenas ser exposta no ar ambiente, para sorver voláteis expostos. Na Tabela 2.5, são apresentados exemplos de aplicações de SPME em amostras gasosas.

Tabela 2.5 - Exemplos de aplicações da SPME em matrizes gasosas

| Matriz | Fibra | Analito | Tipo de amostragem | Técnica |
|---|--------------------|---|--|---------------------------|
| Ar ambiente | PDMS, 100µm | Hidrocarbonetos aromáticos e halogenados | Passiva, com fibra exposta e recolhida | CG-EM CG-DIC CG-DCE |
| Ar ambiente | PDMS, 100µm | Hidrocarbonetos aromáticos, mono e policíclicos | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Ar interior de apartamento | PDMS, 100µm | Benzeno, tolueno, clorobenzeno, tetracloroeto de carbono, o-xileno e n-decano | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Ar interior de laboratório químico | PDMS, 100µm | Análise qualitativa | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Gás de escapamento de automóveis e ar interior de residências, laboratório químico e de computação e sala de estudantes | PDMS, 65µm e 100µm | Formaldeído, tolueno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | Amostragem passiva com fibra exposta | CG-EM e CG-DIC |
| Ar interior de banheiro, cozinha, garagem, lojas e escolas | PDMS/DVB | Heptano, octano, nonano, decano, undecano, dodecano | Passiva com fibra recolhida | CG-DIC |

| | | | | |
|--|---|--|---------------------------------------|--------|
| Ar interior de laboratório químico, sala de fumantes, trem e carro | CW/ PDMS, 75µm | Benzeno, tolueno, etilbenzeno, estireno e xileno | <i>Headspace</i> com SPME | CG-DIC |
| Ar ambiente de indústria | PDMS 100µm | Análise qualitativa | <i>Headspace</i> com SPME | CG-EM |
| Ar ambiente de indústria | PDMS 100µm | Análise qualitativa | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Ar interior de lojas, casas, apartamentos, escritórios e escolas | PDMS/ DVB 65µm | Formaldeído | Passiva com fibra recolhida e exposta | CG-DIC |
| Ar ambiente de indústria | PDMS/ DVB 65µm | Formaldeído | Passiva com fibra recolhida e exposta | CG-DIC |
| Ar expirado | CW/DVB 65µm; PDMS 100µm; PA 85µm; PDMS/ DVB 65µm | Etanol, isopreno e acetona | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Biogás | CX- PDMS | Compostos orgânicos sulfurados | Ativa com fibra exposta | CG-EM |
| Ar interior de laboratório químico | CX- PDMS 75µm e PDMS 100µm | Diclorometano | Passiva com fibra exposta | CG-EM |
| Exposição ocupacional | PDMS 100µm | Trimetilamina | Ativa com fibra exposta | CG-DIC |

Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, visando a desenvolver um método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos que contornasse as limitações operacionais e analíticas dos métodos já existentes, introduziram o método QuEChERS. A sigla empregada para a denominação desse método deriva exatamente das iniciais das palavras da língua inglesa que expressam suas características de desempenho, uma vez que o mesmo é considerado um método rápido (*Quick*), fácil (*Easy*), econômico (*Cheap*), efetivo (*Effective*), robusto (*Rugged*) e seguro (*Safe*).

Esse método surgiu como um novo procedimento de preparo de amostra de matrizes complexas, como frutos e hortaliças, para extração simultânea de agrotóxicos com diferentes propriedades químicas, como polaridade e pK_a . Durante seu desenvolvimento, foi dado grande enfoque para a obtenção de um procedimento dinâmico, possível de ser aplicado em qualquer laboratório e adequado às instrumentações analíticas modernas (PRESTES et al., 2009). O procedimento baseia-se numa etapa de extração inicial monofásica, utilizando solvente acetonitrila, de uma porção de 10g da amostra processada, seguida pela partição líquido-líquido dos agrotóxicos, na presença de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio.

A etapa final de limpeza (*clean up*) do extrato é executada por meio da extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid-phase extraction - D-SPE*), empregando sulfato de magnésio anidro e fase sólida sorvente PSA (*primary secondary amine*), que são misturados ao extrato obtido com acetonitrila. Após a limpeza do extrato, ele é levado à análise por técnica cromatográfica.

O tamanho da amostra

No desenvolvimento do método QuEChERS, a seleção do tamanho da amostra utilizada para a obtenção do extrato para análise baseou-se na observação da quantidade mínima dessa amostra, a qual

fornecia resultados estatisticamente confiáveis. De forma geral, amostras sólidas de alimentos necessitam de etapas mais complexas e demoradas durante seu preparo, como o corte do produto em pedaços mais reduzidos, seguido do processamento em homogeneizadores.

Métodos que utilizam grandes quantidades de amostra requerem maiores volumes de solvente, conduzindo à geração de uma maior quantidade de resíduos, a uma maior preocupação com a segurança do analista e, conseqüentemente, a um maior gasto de materiais e reagentes. A maioria dos métodos multirresíduo para determinação de agrotóxicos utiliza massas de amostra em torno de 50 a 100g, de maneira que, baseado em evidências da literatura, a massa de amostra escolhida para a execução do método QuEChERS foi fixada em 10g. Essa quantidade de amostra foi considerada como representativa e viável para a execução da análise.

O solvente de extração

A seleção do solvente de extração é um ponto crucial no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. As principais características consideradas na escolha do solvente são: possuir habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean up*, separar-se eficientemente de fases aquosas e ser compatível com diferentes técnicas cromatográficas (PRESTES et al., 2009).

Os principais solventes empregados na extração multirresíduo de agrotóxicos são acetona, acetato de etila e acetonitrila. No desenvolvimento do método QuEChERS, o solvente que apresentou características mais convenientes foi a acetonitrila. Entre as vantagens da acetonitrila, pode-se citar a capacidade de extração de uma ampla faixa de agrotóxicos de diferentes polaridades, a extração de menores quantidades de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos, e a capacidade de permitir a remoção de residual de água apenas com o uso de um agente secante, como o sulfato de magnésio anidro (ANASTASSIADES et al., 2003).

Na execução do método, são empregados 10ml de acetonitrila para cada 10g da amostra, dando uma razão de 1ml de solvente para cada 1g de amostra. Esse valor é considerado baixo quando comparado a outros métodos de extração, que apresentam geralmente uma relação amostra e solvente de 2 a 5g por 1ml no extrato final (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

A adição de sais e a separação de fases

A adição dos sais sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) tem a função de promover a separação de fases após a extração. A adição do NaCl inicia a partição líquido-líquido. Esse sal promove o efeito *salting out*, que potencializa a partição dos compostos solubilizados na fase aquosa para a fase orgânica (acetonitrila), possibilitando maiores percentuais de recuperação para os agrotóxicos mais polares. O $MgSO_4$, além de também potencializar o efeito *salting out*, tem a função paralela de remover água, tendo sido escolhido em virtude do seu maior caráter higroscópico em comparação a outros sais. Outro aspecto positivo da utilização de $MgSO_4$ é o fato de o seu processo de hidratação ser exotérmico, elevando a temperatura do sistema a valores em torno de 40 a 45°C na etapa de extração/partição, favorecendo a extração, principalmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

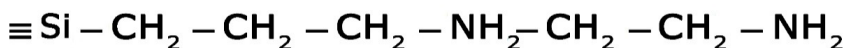
Limpeza do extrato (*clean up*)

A etapa de limpeza da amostra (*clean up*) é fundamental para a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema analítico, pois reduz a presença de compostos interferentes da matriz, deixando a amostra mais adequada à instrumentação analítica. Tradicionalmente, as etapas de limpeza da amostra eram executadas por extração em fase sólida (SPE), porém, no desenvolvimento do método QuEChERS, os autores empregaram uma técnica mais moderna e mais viável que a SPE, sendo esta

a extração em fase sólida dispersiva (*dispersive solid-phase extraction D-SPE*).

Na técnica D-SPE, uma fase sólida sorvente empregada em SPE é adicionada e misturada ao extrato da amostra, sendo distribuída uniformemente por homogeneização, promovendo a retenção dos coextrativos da matriz presentes no extrato. O sorvente empregado no método QuEChERS, o PSA, é uma amina primária e secundária com uma estrutura bidentada que promove um efeito quelante significativo devido à presença dos grupos amino primário e secundário (Figura 2.11) (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

Figura 2.11 - Estrutura do PSA (N-propiletilenodiaminossilano)

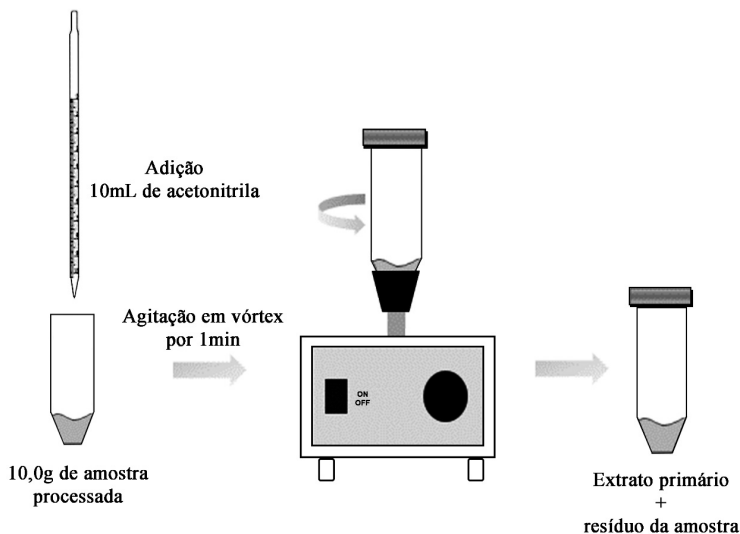


Fonte: Elaborada pelos autores.

Etapas do preparo da amostra via método QuEChERS

Na abordagem do método QuEChERS tradicional, inicialmente, o analista deve pesar aproximadamente 10g da amostra processada em tubo PTFE, seguindo com a adição de 10,0ml de solvente acetonitrila para execução da etapa de extração monofásica dos analitos (Figura 2.12) (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

Figura 2.12 - Extração monofásica no preparo da amostra via QuEChERS



Fonte: Elaborada pelos autores.

Após a etapa de extração monofásica, deve ser conduzida a etapa de partição líquido-líquido, promovida pela adição dos sais MgSO_4 e NaCl . Nesse momento, ambos os sais atuam na separação de fases (fase orgânica / fase aquosa), com o NaCl atuando preponderantemente no efeito *salting out*, e o MgSO_4 atuando na remoção de água oriunda da amostra, dispersa na fase orgânica. Como reportado anteriormente, o processo de hidratação do MgSO_4 é exotérmico, elevando a temperatura do sistema para valores em torno de 40°C a 45°C (reação genérica abaixo) (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

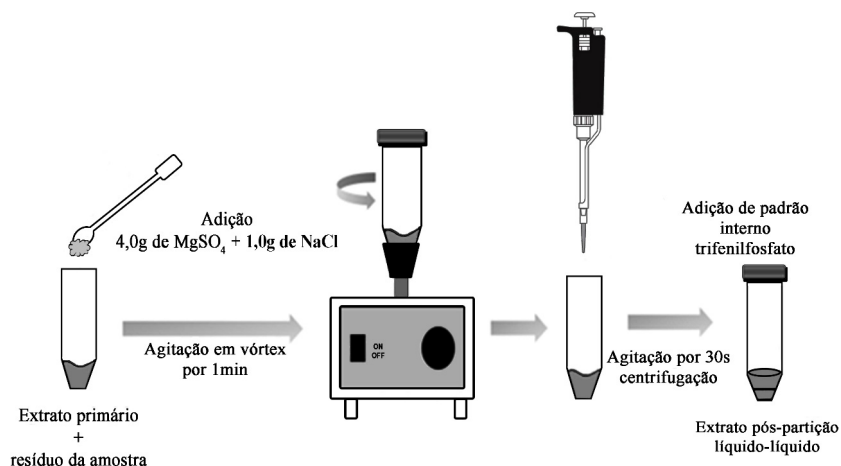


O processo de hidratação do sulfato de magnésio potencializa a extração, principalmente de compostos apolares, melhorando os percentuais de recuperação dos analitos. A adição de NaCl durante

a etapa de extração promove a elevação da força iônica do meio, potencializando a partição de compostos mais polares para a fase orgânica, e também contribuindo para melhores níveis de recuperação (ver capítulo “Validação de métodos analíticos em cromatografia gasosa”). A variação da quantidade de NaCl adicionado na etapa de partição possibilita o controle da faixa de polaridade dos compostos extraídos, sendo possível o controle da extração de interferentes polares, como açúcares (glicose, frutose, sacarose) e ácidos orgânicos, quando da análise de alimentos (ANASTASSIADES et al., 2003; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Após a etapa de partição, deve-se adicionar um composto que será empregado como padrão interno no processo de calibração analítica, sendo recomendado pelos autores do método o composto trifetilfosfato (Figura 2.13) (ANASTASSIADES et al., 2003).

Figura 2.13 - Etapa de partição com a adição de sais e procedimento de introdução do padrão interno

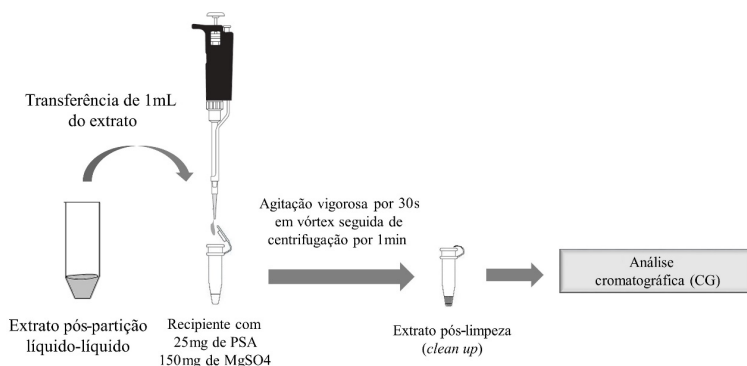


Fonte: Elaborada pelos autores.

A etapa final, de limpeza do extrato da amostra (*clean up*), baseada em *extração em fase sólida dispersiva* (D-SPE), é condu-

zida com a adição de fase sorvente amina primária e secundária (PSA) e uma quantidade adicional de MgSO_4 diretamente no extrato da amostra obtido na etapa anterior. O PSA, com seu efeito quelante, atua na remoção de coextrativos polares presentes na matriz, como ácidos orgânicos livres. O MgSO_4 atua na remoção de umidade (H_2O) residual remanescente no extrato após as etapas anteriores. A proporção entre PSA, MgSO_4 e volume de amostra é de 25mg de PSA para 150mg de MgSO_4 para cada 1ml de extrato da amostra. Nesta, objetiva-se a remoção de compostos que possam vir a ser potenciais interferentes (ANASTASSIADES et al., 2003; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Figura 2.14 - Etapa de limpeza do extrato da amostra no método QuEChERS

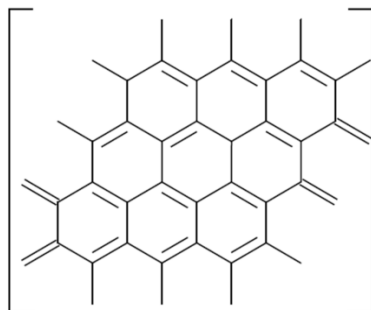


Fonte: Elaborada pelos autores.

Apesar da eficiência da fase PSA na remoção de moléculas polares, como ácidos orgânicos, essa fase sorvente não se mostra efetiva na remoção de compostos apolares coextrativos, como clorofila e esteróis presentes nas amostras de alimentos de origem vegetal. Para contornar essa limitação, foi incluída na etapa de limpeza a adição de carbono grafitado (GCB - *graphitized carbon black*), que atua de forma bastante eficiente na remoção de pigmentos, como a clorofila, e

outros compostos apolares, como os esteróis (PRESTES et al., 2009; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

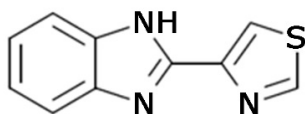
Figura 2.15 - Representação da estrutura química do carbono grafitado GCB



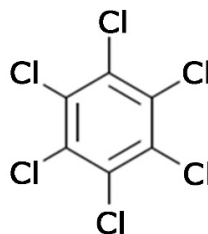
Fonte: Elaborada pelos autores.

A estrutura interna do carbono grafitado é baseada em camadas superpostas de sistemas cíclicos insaturados condensados (Figura 2.15), que lhe conferem a propriedade de forte interação com analitos que possuam sistemas cíclicos planares em suas moléculas (Figura 2.16). Esse é um comportamento indesejável por proporcionar a perda de analitos apolares na etapa de limpeza do extrato (PRESTES et al., 2009; BEYER; BIZIUK, 2010; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Figura 2.16 - Representações de estruturas de composto com sistemas cíclicos planares em suas moléculas: tiabendazol e hexaclorobenzeno



Tiabendazol



Hexaclorobenzeno

Fonte: Elaborada pelos autores.

Após o desenvolvimento e consolidação do método QuEChERS original, outras abordagens foram elaboradas, visando a eliminar alguns problemas associados à influência do pH da amostra sobre a forma química dos analitos durante a extração. Entre as principais versões, podemos citar QuEChERS-acetato, desenvolvido por Lehotay, Maštovska e Lightfield, e a versão QuEChERS-citrato, desenvolvida por Anastassiades e colaboradores. Nessas abordagens, são empregados outros sais durante as etapas de extração objetivando ajustar o pH da amostra (pH = 4,8; QuEChERS-acetato/ pH = 5,0 - 5,5; QuEChERS-citrato) (LEHOTAY; MAŠTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Um bom exemplo de aplicação do método QuEChERS, especificamente da abordagem QuEChERS-citrato, é a determinação multirresíduo de 45 pesticidas de diferentes grupos químicos, incluindo organoclorados, organofosforados, piretróides, entre outros, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), apresentando bom desempenho na determinação dos analitos (BARBOSA, 2013). Sousa e colaboradores desenvolveram metodologia baseada no método QuEChERS e CG/EM para a determinação multiclasse de 35 pesticidas em melões, demonstrando a eficiência desse método de preparo, simples e rápido, para a obtenção de resultados analíticos confiáveis (SOUSA et al., 2013).

Desde o seu desenvolvimento e publicação, o método QuEChERS tem obtido significativa popularidade no campo da análise de compostos tóxicos utilizando técnicas cromatográficas, não sendo restrito apenas à determinação de pesticidas em matrizes de alimentos, mas sendo este seu uso primordial. Modernamente, já existem, na literatura, publicações oriundas de pesquisas que denotam a aplicação da técnica QuEChERS na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em diferentes espécies de peixes, na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em tecido animal e na determinação multirresíduo de poluentes emergentes em água e sedimentos (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RAMALHOSA et al., 2009).

Aplicações

Paz et al. (2015) testaram cinco variações do método QuE-ChERS, baseado no método original, para determinar resíduos de 14 pesticidas organoclorados na casca, na fruta e na polpa comercial de tamarindo. Nessas variações, foi estudada, na etapa de *clean-up*, a influência da amina primária e secundária (PSA), do octadecilsilano ligado à sílica porosa (C18), do sulfato de magnésio e do carbono negro grafitado. Os autores avaliaram também a influência de banho ultrassônico e vórtex na etapa de preparo da amostra. Com esse estudo, chegou-se a resultados em que as recuperações médias gerais foram consideradas satisfatórias, apresentando valores entre 70 e 115%, com precisão entre 2 e 15%. Segundo a literatura, as taxas de recuperação foram consideradas satisfatórias devido a uma etapa inicial de liofilização da fruta e da polpa comercial, que melhora o contato entre a matriz e o solvente extrator. Os limites de detecção e quantificação obtidos para as partes do fruto foram:

Tabela 2.6 - Limites de detecção e quantificação para a determinação de 14 pesticidas organoclorados em tamarindo

| | Limite de detecção ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | Limite de quantificação ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) |
|------------------------------|--|---|
| Casca | 8,0 - 21 | 27 - 98 |
| Polpa da fruta | 4 - 10 | 15 - 49 |
| Polpa comercial congelada | 2 - 5 | 7 - 27 |

Fonte: Paz et al. (2015).

Referências bibliográficas

- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.
- BARBOSA, P. G. A. *Desenvolvimento de método analítico para determinação multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi utilizando as técnicas QuEChERS e CG/EM*. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANCAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.
- BEYER, A.; BIZIUK, M. Comparison of efficiency of different sorbents used during clean-up of extracts for determination of polychlorinated biphenyls and pesticides residues in low-fat food. *Food Research International*, v. 43, p. 831-837, 2010.
- CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- CANUTO, K. M.; GARRUTI, D. S.; MAGALHÃES, H. C. R. *Microextração em fase sólida: método analítico prático para extração de compostos voláteis de frutas*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 5 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 166).

DEAN, J. R. *Extraction techniques in analytical science*. Newcastle, UK: John Wiley & Sons, 2009.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 892-896, 2004.

DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. *Scientia Plena*, v. 4, n. 7, 2009.

GUADARRAMA, A. et al. Discrimination of wine aroma using an array of conducting polymer sensors in conjunction with solid-phase micro-extraction (SPME) technique. *Elsevier*, v. 77, ed. 2, p. 401, 2001.

HELENO, F. F. et al. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por head-space e microextração em fase sólida. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 329-336, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multirresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida moderna*. Átomo: São Paulo, 2009.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pes-

ticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J AOAC Int*, v. 88, n. 2, p. 615-629, Mar./Apr., 2005.

LONG, A. R.; SHORT, C. R.; BARKER, S. A. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 502, p. 87-94, 1990.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography*. 2. ed. Canada: John Wiley & Sons, 2009.

MILLS, A. G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*, v. 902, p. 267-287, 2000.

NICHOLSON, J. W. *The chemistry of polymers*. 3. ed. Kent, UK: RSC Publishing, 2006.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 646-654, 2005.

PAWLISZYN, J. *Solid-phase microextraction: theory and practice*, New York: Willey-VHC, 1997.

PAWLISZYN, J.; Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, v. 38, 2000.

PAZ, M. et al. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: peel, fruit and commercial pulp. *Food Control*, v. 54, p. 374-382, 2015.

PINHEIRO, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons from asphalt binder: extraction and characterization. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 2, p. 222-228, 2009.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

PRESTE, O. D. et al. QuEChERS: um método de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados e fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAMALHOSA, M. J. et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Journal of Separation Science*, n. 32, p. 3529-3538, 2009.

SIGMA-ALDRICH. *Selection guide for Supelco SPME fibers*. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

SILVA, V. P. A. *Aplicação da técnica de microextração em fase sólida na determinação de agrotóxicos e avaliação do efeito matriz em água*. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SIMPSON, N. J. K.; BARKER, S. A. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2000.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. Tradução: Marco Grassi. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOUSA, J. S. et al. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level

of pesticides residues in Brazilian melons. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2675-2681, 2013.

SOUZA, M. R. R. et al. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchemical Journal*, v. 110, p. 395-401, 2013.

STEVENS, M. P. *Polymer chemistry: an introduction*. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999. 34 p.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 39, p. 233-254. 2004.

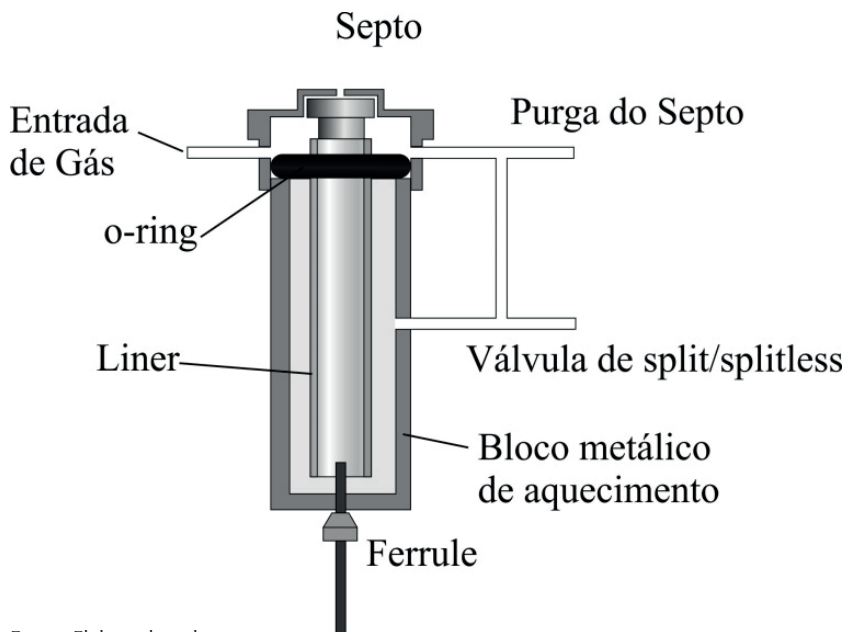
WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, v. 125, n. 3, p. 803-812, 2011.

SISTEMA DE INJEÇÃO

Ari Clecius Alves de Lima
Pablo Gordiano Alexandre Barbosa
Vítor Paulo Andrade da Silva
Ronaldo Ferreira do Nascimento

A análise cromatográfica começa efetivamente com a injeção da amostra no injetor (vaporizador), o qual, em sua forma básica, é composto de um bloco metálico que é conectado à coluna. Na maioria das aplicações atuais, usa-se um pequeno tubo de quartzo ou vidro (*liner*) com o objetivo de promover um aquecimento mais homogêneo; na parte superior, existe um anel de vedação e um septo por onde a amostra é injetada com o auxílio de uma seringa; na parte inferior, o *liner* se conecta à coluna (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Sistema de injeção



Fonte: Elaborada pelos autores.

A escolha adequada das condições e componentes do sistema de injeção proporciona uma maior reprodutibilidade e menores limites de detecção. Existem vários parâmetros envolvidos que podem interferir no resultado da análise, podemos citar: preparo de amostra, escolha do solvente, propriedades do analito, tipo de seringa, temperatura do injetor, septo, anel de vedação, bloco metálico, modo de injeção, tipo de *liner*, outros parâmetros do injetor (MCNAIR; MILLER, 1997). O preparo de amostra, já abordado no capítulo anterior, não será mencionado diretamente.

Escolha do solvente

A escolha do solvente é uma variável crítica, pois a vaporização da amostra é dependente de suas propriedades. O solvente,

ao ser dispersado pela seringa sob a forma de spray, vaporiza-se quase que instantaneamente (método clássico). Para isso, é necessário que a temperatura do injetor seja maior do que o ponto de ebulição do solvente e que os analitos sejam solúveis no solvente. Este deve ainda ser de alta pureza para não contaminar a análise, o que é fundamental na análise de compostos traços. Cuidados devem ser tomados quanto às impurezas presentes no solvente, por exemplo, a acetona é um dos solventes mais utilizados em cromatografia gasosa, mas apresenta impurezas de aldeídos, metanol e álcool isopropílico (WAHL; BOLZ; WAHL, 2010).

Reações do solvente dentro do sistema de injeção também são um problema. Tais reações podem ser resultado da interação do solvente com o analito ou até do solvente com grupos silanóis do septo. Água e metanol, por exemplo, podem produzir reações de hidrólise e alcoólise, formando produtos com silanóis, os quais se acumulam na porta de injeção, contaminando, depois de numerosas injeções, as corridas cromatográficas. À medida que o número de injeções aumenta, a concentração desses compostos também aumenta. Sua formação, portanto, deve ser avaliada quando se usar água, metanol ou etanol como solvente (AI; SUN; DONG, 2014).

Propriedades do analito

Algumas características são desejáveis para a análise por cromatografia gasosa. O analito deve ser volátil ou deve ter pressão de vapor considerável. Deve ainda ter solubilidade significativa no solvente que será usado para injeção em sistema cromatográfico. Em casos em que essas condições não sejam satisfeitas, é possível realizar modificações químicas na estrutura do analito a ser analisado (derivatização). No caso de analitos muito polares, por exemplo, pode ocorrer a adsorção de parte deles nas paredes do *liner*, sendo indicado, para esses compostos, o uso de *liner* inerte, de modo a impedir perda de analito.

Derivatização

A derivatização pode ser definida como uma modificação química de um composto com o objetivo de produzir um novo composto, com estrutura similar ao de origem, porém mais volátil e estável para análise em cromatografia gasosa. A mudança normalmente se dá pela troca de um grupo funcional específico, como -OH, -SH e -NH₂, que são bons grupos de saída. Diminui-se, dessa forma, a polaridade do composto, tornando-o mais volátil.

Pela derivatização, é possível também aumentar a sensibilidade de um determinado composto. A introdução de halogenetos em um composto, por exemplo, aumenta sua sensibilidade em um detector de captura de elétrons.

Os principais tipos de derivatização são sililação, alquilação e acilação.

Sililação

Este processo objetiva a troca de hidrogênios ativos por TMS (trimetilsilano), produzindo derivados com grupos silil mais voláteis e mais estáveis termicamente. O mecanismo de sililação ocorre por ataque nucleofílico (S_N2). Quanto melhor o grupo de saída, melhor a sililação. Reatividade: álcool, fenol, carboxil, amina, amida, hidroxil. A ordem para os álcoois é 1>2>3.

Alquilação

A alquilação reduz a polaridade das moléculas por meio da troca de um hidrogênio ativo por grupo alquil. Estes reagentes são usados para modificar compostos com hidrogênios ácidos, semelhantes a ácidos carboxílicos e fenóis, gerando ésteres, éteres, alquil aminas e alquil amidas. O principal mecanismo é o deslocamento nucleofílico.

Acilação

Consiste na utilização de um ácido carboxílico ou derivado para converter grupamentos -OH, -SH e -NH de compostos em ésteres, tioésteres e amidas, respectivamente. Com isso, é possível melhorar a estabilidade de compostos termicamente instáveis. A acilação também permite obter compostos com menor polaridade e maior volatilidade. O processo de acilação possibilita à molécula maior sensibilidade em relação ao detector de captura de elétrons (ECD) devido à introdução de grupos de captura de elétrons.

Esterificação e transesterificação

A esterificação, que é o método mais popular de alquilação, é a reação de um ácido com um álcool, na presença de um catalisador, para formar um éster. O processo envolve a condensação do grupo carboxilo do ácido e do grupo hidroxilo do álcool, com a eliminação de água. A esterificação é melhor realizada na presença de um catalisador (cloreto de hidrogênio, por exemplo), que é removido com a água. Ésteres alquílicos oferecem excelente estabilidade e fornecem amostras de preparo rápido para a análise por CG.

A transesterificação é o deslocamento do álcool, a partir de um éster, por outro álcool. Tem sido amplamente utilizada para fazer ésteres de álcoois superiores dos de álcoois inferiores. Pode ser realizada com um catalisador ácido ou básico, usando metanol para reagir com gorduras e óleos.

Tipos de seringa

A escolha da seringa varia de acordo com o modo de injeção (manual ou automático), estado físico da amostra (líquido ou gasoso), volume da amostra a ser injetada e outros requisitos operacionais.

Quanto ao modo de injeção, podemos classificá-lo em manual e automático. A agulha do tipo cone é recomendada para injeção

com autoamostrador; a do tipo bevel 20°, para injeção manual; a dual gauge é ideal para injeções on-column em coluna megabore.

Quanto ao volume da seringa, a quantidade injetada não deve ser menor que 10% do volume nominal da seringa. Por exemplo, não se deve injetar menos que 0,5µl para uma seringa de 5µl; não menos que 1µl para uma seringa de 10µl. O erro de escala próximo aos extremos se torna maior. Para um fator de segurança mais conservador, pode-se usar 20%.

Cuidados com a seringa

O uso adequado da seringa previne sua contaminação, degradação e inutilização. Sempre após o uso, é aconselhável realizar um procedimento de limpeza.

Para injeção manual, a seringa deve ser lavada por 5-10 vezes em seu volume total para evitar contaminação entre amostras, e o solvente deve ser aspirado e dispersado repetidas vezes. O mesmo deve ser realizado com a amostra por 2-3 vezes. Para autoamostrador, a limpeza da seringa é feita automaticamente. Deve-se lavar com o solvente adequado de acordo com a polaridade do que se quer remover. Caso a seringa esteja muito suja, uma limpeza severa deve ser realizada: lavar com água destilada, lavar com acetona, remover o plunger e enxugar com um tecido, recolocar o plunger e lavar com acetona, aguardar a seringa secar.

Temperatura do injetor

Um fator importante na injeção é a escolha da temperatura de injeção. Uma regra muito conhecida é que a temperatura deve ser de 20-40°C acima da temperatura final da programação de temperatura na coluna ou deve estar acima da temperatura do composto menos volátil. Essa regra, entretanto, tem validade limitada a compostos voláteis, pois, para compostos semivoláteis, seria inviável atingir a temperatura do composto menos volátil.

Qual temperatura escolher? Um valor típico está entre 265-275°C. Outros valores podem ser adotados, caso dados da literatura

não estejam disponíveis. No caso de um novo método, um planejamento adequado de otimização do sistema de injeção pode indicar a temperatura ideal. Para isso, devem ser levadas em consideração as propriedades do solvente e a solubilidade dos compostos a serem detectados. Na Tabela 3.1, podemos observar algumas temperaturas utilizadas para análise de determinados compostos:

Tabela 3.1 - Amostra/temperatura de injeção

| Amostra | Solvente/T _{ebulição} | Temperatura do injetor | Referência |
|--------------------------------------|--|--|----------------------------------|
| HPAs/Oxi-HPAs | Diclorometano | PVT: Tinicial - 28°C Evaporação 1min 50°C Rampa 1- 14°C/s até 320°C Rampa 2 -14°C/s até 350°C | (WALGRAEVE et al., 2015) |
| HPAs em fumaça de cigarro | Ciclo-hexano | 250°C | (STEPANOV et al., 2010) |
| Pesticidas em vegetais | Acetona, acetonitrila, éter de petróleo | 250°C | (SELIM; EL-SAEID; DOSSARI, 2011) |
| Desruptores endócrinos em sedimentos | Clorofórmio, clorobenzeno, tetracloroetileno | 300°C | (YUAN et al., 2015) |
| BTEX em água subterrânea | Metanol | 200°C | (KAMAL; KLEIN, 2010) |
| Plasticantes em água potável | Acetato de etila/metanol | 270°C | (SOUZA et al., 2012) |
| Pesticidas | Água (Extração SPME) | 250°C | (MILHOME et al., 2015) |
| Ácidos graxos | Hexano | 250°C | (BRAGA et al., 2015) |

Fonte: Elaborada pelos autores.

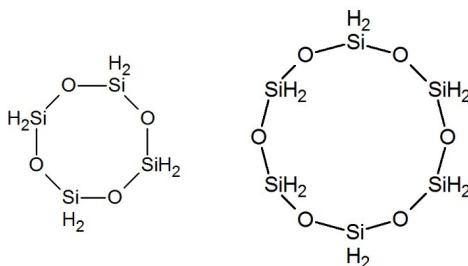
Septo

Septos são peças fabricadas em várias geometrias e materiais, como borracha/PTFE, silicone/PTFE ou poliimida coberta com silicone, que são usadas como componentes de vedação e entrada para as amostras em cromatografia gasosa. Normalmente, os septos são escolhidos de acordo com a temperatura de análise no injetor. A maioria dos septos tem uma faixa de aplicação para as temperaturas de 100-350°C.

Apesar de serem fabricados para resistir a temperaturas elevadas, é inevitável a degradação mecânica e térmica do septo. Como consequência, esses produtos de degradação podem ser observados durante uma análise cromatográfica em forma de picos fantasmas ou como aumento da linha de base. O processo de desgaste do septo é conhecido como sangria ou sangramento.

O septo é feito de poldimetilsiloxano puro, que é fortemente reticulado. Estabilizadores (ftalatos) também podem ser adicionados para melhorar sua vida útil. Diferentes tipos de septo estão disponíveis, todos com objetivos similares: penetração fácil, contaminação mínima e uma longa vida útil. O problema é que, a temperaturas mais elevadas, o septo irá começar a sangrar. A sangria do septo produzirá, no cromatograma, picos provenientes de produtos de degradação cíclicos gerados como uma série homóloga de partida com D3 (três unidades de siloxano em um círculo) e procedendo-se a D10-D12 (Figura 3.2) (PROBLEMS, 2015).

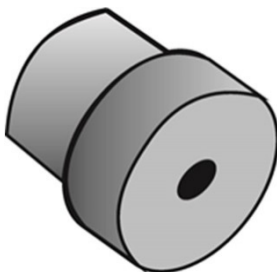
Figura 3.2 - Produtos de degradação do septo D4 e D9



Fonte: Elaborada pelos autores.

Para proteger os resultados desses compostos indesejáveis, é necessária uma escolha adequada do septo de acordo com as temperaturas que serão utilizadas no injetor. Um septo adequado deve ter propriedades como baixo sangramento, resistência a vazamentos e fácil penetração. Além disso, não deve desprender pedaços para dentro do *liner* (Figura 3.3):

Figura 3.3 - Septo

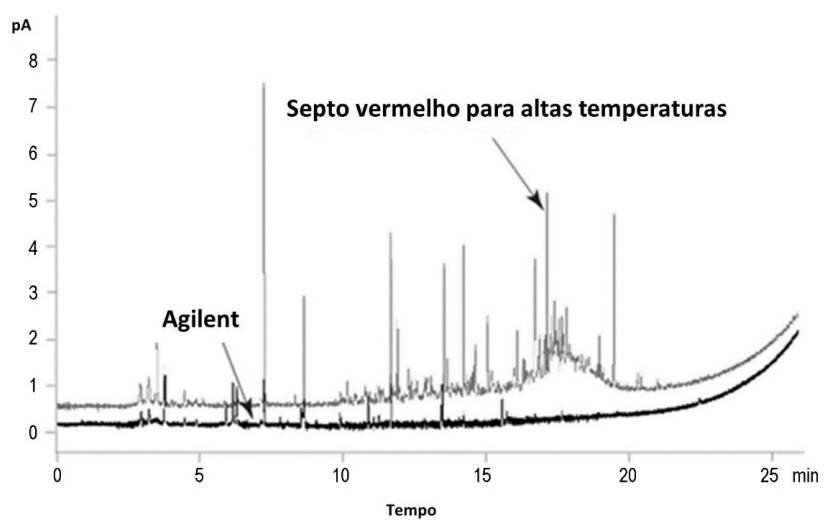


Fonte: Elaborada pelos autores.

Outro ponto importante a ser observado é a diferenciação entre o sangramento da coluna e o sangramento do septo. O sangramento da coluna é fácil de ser observado por deriva da linha de base, enquanto o sangramento do septo pode ser percebido pelo surgimento de picos bem definidos em detectores de espectrometria de massa, gerando os fragmentos típicos 73 m/z, 147 m/z, 207 m/z, 221 m/z, 281 m/z, 295 m/z, 355 m/z, 429 m/z.

A sangria do septo é mais perceptível em análise por cromatografia gasosa por espectrometria de massa. A purga do septo deve ser adequada para evitar esse tipo de contaminação. Assim, a escolha do septo também deve ser analisada. Por exemplo, o fabricante recomenda um septo específico para cada faixa de trabalho. Se observada tal especificação, não ocorrerá a presença de sangria do septo no cromatograma. Na Figura 3.4, podemos observar o comparativo entre dois cromatogramas, um com septo adequado (cromatograma com septo *Agilent*) e outro com septo em que aparece sangria.

Figura 3.4 - Sangramento do septo

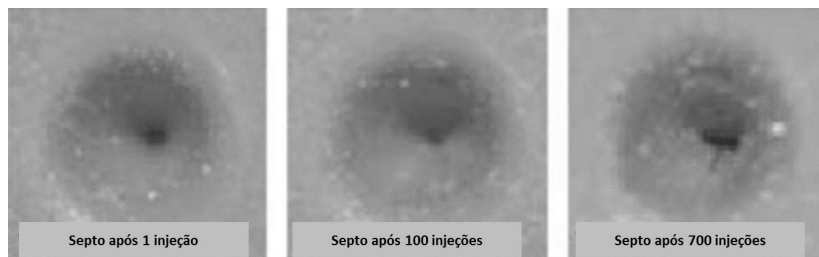


Fonte: Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-gc-inlet-maintenance-have-you-really-heard-it-al>> (Reproduzido com permissão).

A periodicidade de troca do septo também deve ser observada para evitar problemas nas análises, como perda de amostra ou não liberação do sistema para as condições especificadas por queda de pressão. Na Figura 3.5, podemos observar um septo depois de sucessivas injeções. Após um determinado número de injeções, a pressão interna na câmara de ingestão é suficiente para vencer a vedação do septo pelo furo. Isso ocorre porque o sistema interno da câmara de injeção está submetido a uma pressão maior que a pressão externa.

Não existe uma regra simples para a troca do septo. Com o tempo, o analista deve observar o aspecto do septo após a troca e os resultados de suas análises. Geralmente, muda-se o septo a cada 100 injeções, contudo, para injeções no modo SPME (diâmetro maior da seringa), provavelmente, a frequência de troca deverá ser reduzida.

Figura 3.5 - Septo após 700 injeções



Fonte: Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-gc-inlet-maintenance-have-you-really-heard-it-al>> (Reproduzido com permissão).

Apesar de o septo ser essencial no sistema de vedação, já existem sistemas de injeção que não usam septo, possuindo uma estrutura de vedação na linha de fornecimento de gás. Com o injetor livre de septo, é possível utilizar a injeção com temperaturas tão elevadas como 450°C (ITO et al., 2006).

Anel de vedação O-ring

O *O-ring* é um anel de vedação entre o meio externo e o injetor. Para um ótimo sistema de vedação, é importante uma escolha adequada do *O-ring*, sendo os principais materiais utilizados *O-rings* VITON®, *O-rings* de silicone e termo *O-rings*. Este último é adequado para altas temperaturas, de até 375°C, apresentando baixa fragmentação ao ser removido, baixa permeabilidade a gases e boa compressibilidade a altas temperaturas, sem deformação. Essas características fornecem um bom sistema de vedação. Em detectores por espectrometria de massa, pode surgir o fragmento 149 m/z, devido à degradação do anel de vedação (*O-ring*). Para análise de ftalatos, deve-se verificar se o fragmento provém da amostra ou do anel de vedação.

Bloco metálico

O bloco metálico é um componente que envolve o sistema de injeção. Conectado ao bloco, há uma resistência elétrica com um termostato que permite ajustar a temperatura do injetor.

Modo de injeção

Uma escolha inadequada dos componentes de injeção pode levar a uma resposta com baixa sensibilidade ou a uma ausência de resposta, bem como a picos fantasma, entre outros problemas. Alguns requisitos básicos devem ser levados em consideração no que se refere ao sistema de injeção:

- A quantidade injetada não deve sobrecarregar a coluna nem causar dispersão ou formação de caudas;

- A largura da câmara de expansão deve ser pequena o suficiente quando comparada com a dispersão do processo cromatográfico e grande o suficiente para comportar a expansão da amostra injetada. Neste ponto, vale salientar um detalhe muito importante, que é o aquecimento na câmara de expansão dentro do sistema de injeção.

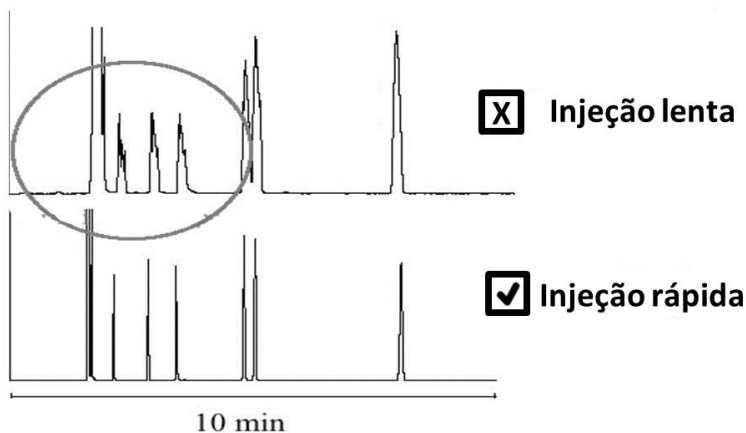
O modo de injeção pode ser basicamente de três tipos: *split*, *splitless* e direta. Contudo, existem outros modos, como injeção de grande quantidade de amostra (LVI), injeção com programação de temperatura e injeção *on-column*.

O volume injetado para amostras líquidas é de 0,2-20 μ L em colunas empacotadas, e de 0,01-3 μ L, em colunas capilares. Para amostras gasosas, injeta-se de 0,1-50ml em colunas empacotadas e de 0,001-0,5ml em colunas capilares. Amostras sólidas devem, primeiramente, ser solubilizadas em algum solvente.

A velocidade com que a amostra é injetada influencia na separação das bandas cromatográficas. A utilização de autoamostradores possibilita a obtenção de resultados mais precisos em relação à in-

jeção manual. Na Figura 3.6, podemos observar um cromatograma após uma injeção lenta e após uma injeção rápida:

Figura 3.6 - Efeito da velocidade de injeção



Fonte: Disponível em: <<https://www.trajanscimed.com/pages/training-gc-injection>> (Reproduzido com permissão).

Injeção *split/splitless*

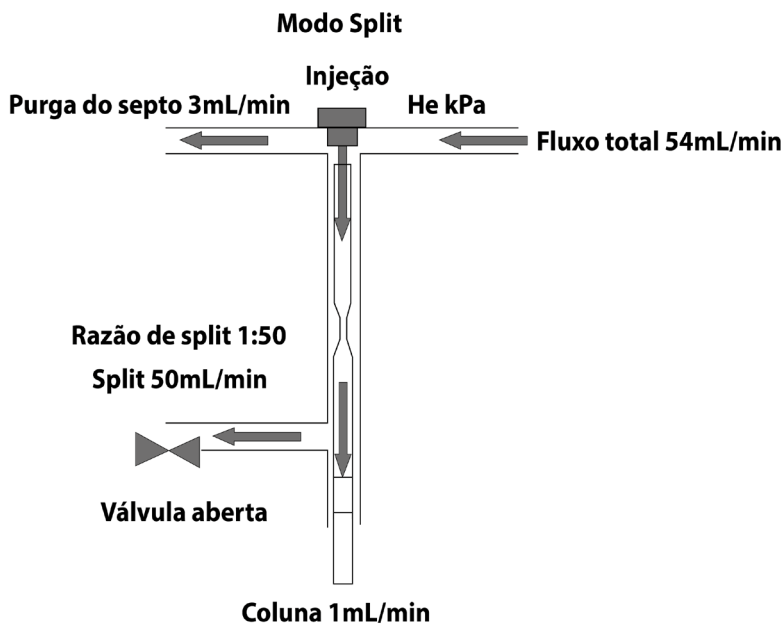
Quanto à divisão de fluxo, a injeção pode ser classificada como injeção no modo *split* e injeção no modo *splitless*. Esse controle da divisão de fluxo é realizado por três válvulas: uma válvula tipo agulha que controla a purga do septo; uma válvula solenoide; e uma válvula tipo agulha que controla a razão de *split*. Quando a válvula solenoide está fechada, ocorre injeção do tipo *splitless*; se estiver aberta, ocorre a injeção no modo *split* (KENNEDY; KNILL, 2003).

Injeção modo *split*

Na injeção no modo *split*, normalmente, a amostra encontra-se no estado líquido, sendo introduzida em um espaço aquecido, *liner*, que rapidamente vaporiza a amostra, misturando-a com o gás de

arraste e gerando um fluxo turbulento. O fluxo da mistura gasosa é rapidamente conduzido para a coluna, sendo que apenas uma fração dessa mistura (vapor da amostra + gás de arraste) adentra a coluna; o restante é descartado. Esta modalidade de injeção basicamente tem duas funções: rápida evaporação e pequeno tempo de residência no *liner*, proporcionando uma pequena pluma de injeção e a introdução de menor quantidade de amostra. Normalmente, para amostras com muita sujeira, que pode vir a danificar a coluna, é recomendado colocar uma lã de vidro para reter compostos não voláteis. Na Figura 3.7, podemos observar o tipo de injeção no modo *split*, em que temos um fluxo total de 54 mL/min, 3 mL são descartados na purga do septo e 1 mL vai para a coluna:

Figura 3.7 - Injeção modo *split*



Fonte: Elaborada pelos autores.

Para obter a quantidade que vai para a coluna, podemos efetuar o seguinte procedimento:

- O primeiro passo é medir a taxa de fluxo de *split*. Essa tarefa pode ser realizada com um fluxômetro. O fluxo de *split* pode ser facilmente medido com um fluxômetro de bolha, genericamente conhecido como bolhômetro; o fluxo na coluna pode ser calculado pela Equação 3.1:

$$F_{Coluna} = \frac{\pi}{4} \cdot d_c^2 \cdot \frac{L}{t_0} \cdot \frac{273+T_e}{273+T_{Coluna}} \cdot \frac{2}{3} \cdot \frac{\left[\left(\frac{P_i}{P_e}\right)^3 - 1\right]}{\left[\left(\frac{P_i}{P_e}\right)^2 - 1\right]} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Em que:

d_c = diâmetro da coluna [mm];

L = comprimento da coluna [m];

t_0 = tempo morto [min];

P_i = pressão absoluta interna [bar];

P_e = pressão externa, normalmente 1bar;

T_e = temperatura externa [°C];

T_{coluna} = temperatura na coluna [°C].

Apesar de esse cálculo poder ser realizado manualmente, os *softwares* do equipamento já calculam o fluxo na coluna. Se um detector por espectrometria de massa é utilizado, a P_e pode não ser conhecida com precisão, e a equação se reduz a:

$$F_{Coluna} = \frac{\pi}{4} \cdot d_c^2 \cdot \frac{L}{t_0} \cdot \frac{273 + T_e}{273 + T_{Coluna}} \cdot \frac{2}{3} \cdot P_i \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Com os dados de fluxo na coluna e fluxo de *split*, calcular, então, a razão de *split* pela fórmula abaixo:

$$\text{Razão de } split = \frac{F_{Coluna}}{F_{split} + F_{Coluna}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Em que:

F_{Coluna} = fluxo na coluna (ml/min)

F_{split} = fluxo *split* (ml/min)

Como o fluxo na coluna é muito menor que o fluxo *split*, a Equação 3.4 pode ser simplificada, sendo escrita na forma:

$$\text{Razão de } split = \frac{F_{Coluna}}{F_{split}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Na maioria das vezes, a razão de *split* se situa entre 1:5 e 1:1000, ou seja, apenas 1/5 ou 1/1000 vai para a coluna. A desvantagem desse tipo de injeção é a possibilidade de discriminação (produção de um cromatograma que não representa verdadeiramente a composição da mistura) (CARLIN; DEAN, 2013). A injeção no modo *split* é adotada, normalmente, para análise de componente majoritário, sendo largamente utilizada em análise petroquímica, análise de alimentos, fragrâncias e óleos essenciais (JENNINGS; SHIBAMOTO, 1980). Razões de *split* muito pequenas levam à formação de picos assimétricos à esquerda e ocasionam sobrecarga na coluna; razões de *split* muito grandes levam a problemas com limite de detecção. Para colunas de alta capacidade e/ou colunas de filme espesso, razões de *split* 1:5 a 1:20 são comuns. Por exemplo, para uma faixa de concentração de 1 a 0,001 $\mu\text{g ml}^{-1}$ na construção de uma curva de calibração para análise de HPAs, pode-se usar um volume de injeção 2 μl , com *split* na razão 1:5 (CRISTALE; SILVA; MARCHI, 2008).

Vantagens e desvantagens

Devido à grande quantidade de perda de amostra, essa modalidade de injeção não é adequada para análise de traços (<50ppm). A amostra pode se degradar no injetor, dependendo da temperatura deste. A degradação pode ocorrer em maior intensidade em *liner* preenchido com lã de vidro. A reprodutibilidade das injeções pode ser influenciada pela geometria do *liner*. Quando o cromatógrafo está equipado com coluna de diâmetro interno relativamente estreito, é recomendado utilizar o modo de injeção *split*, para evitar o sobrecarregamento da coluna.

Injeção modo *splitless*

Como na injeção no modo *split*, a injeção no modo *splitless* é realizada em um *liner* aquecido. A diferença é que, neste caso, a válvula de divisão de fluxo está fechada, e tudo que é injetado vai para a coluna. Um ponto importante a ser observado na injeção no modo *splitless* é que o fluxo de *split* é o mesmo que vai para a coluna, portanto, a amostra demora um tempo maior para ser removida do *liner* para a coluna, e deve-se aguardar um tempo maior para se iniciar a programação de temperatura. O tempo típico para abertura da válvula é em torno de 1 minuto.

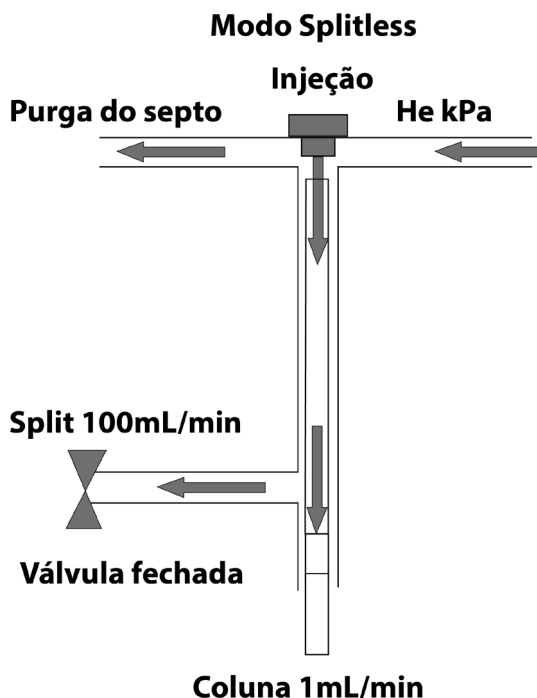
A injeção no modo *splitless* é mais adequada para análise de traços, de maneira que a amostra fica no *liner* um curto período de tempo (tempo de *splitless*) e só depois é conduzida para a coluna, por meio do fluxo de gás. Problemas de alargamento de banda podem ocorrer se a amostra não for reconcentrada na coluna. Assim, duas medidas podem ser utilizadas para prevenir esse efeito:

Câmara a frio: adequada para componentes com altos pontos de ebulição. Nesse procedimento, a temperatura inicial do forno é suficientemente baixa, de forma a que a amostra seja condensada no início da coluna, reconcentrando-a.

Efeito do solvente: promove a pré-concentração de analitos com ponto de ebulição próximo ao do solvente. Para uma boa separação

cromatográfica, recomenda-se que a temperatura inicial da corrida seja 20°C abaixo do ponto de ebulição do analito mais leve e que os pontos de ebulição dos analitos mais leves sejam pelo menos 30°C acima do ponto de ebulição do solvente. Deve-se ter cuidado para que o volume de expansão da amostra seja tomado em relação ao volume do *liner*. Se a amostra expandir demais, pode extrapolar e sair do *liner*, contaminando a linha de gás e gerando perda de amostra pela purga do septo (Figura 3.8):

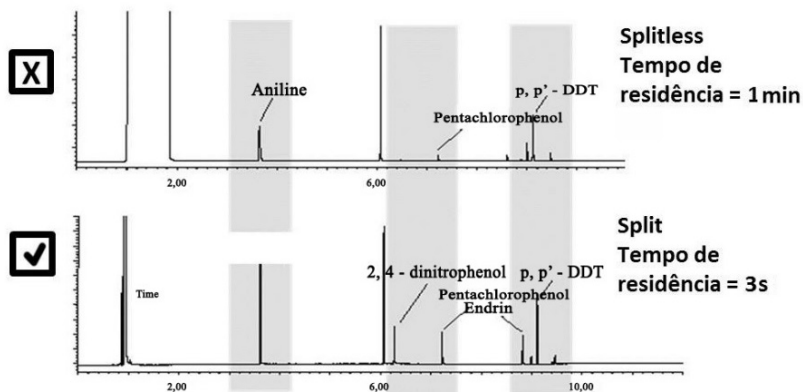
Figura 3.8 - Injeção modo *splitless*



Fonte: Elaborada pelos autores.

Uma desvantagem da injeção no modo *splitless* é que a amostra permanece mais tempo no *liner*, podendo haver degradação da amostra (“*split vs splitless*”) (Figura 3.9):

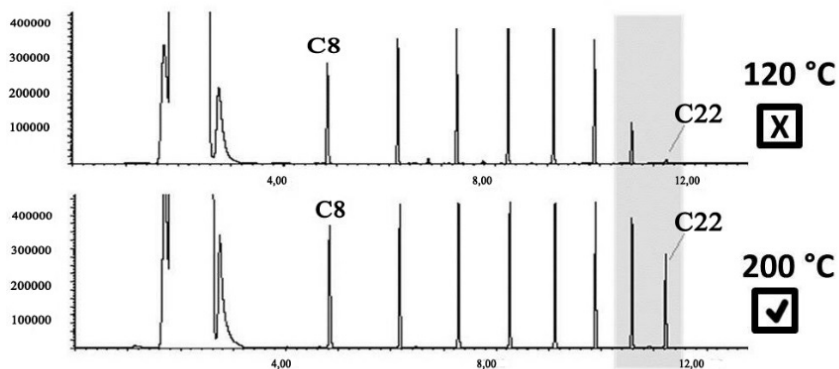
Figura 3.9 - Degradação de amostra no injetor



Fonte: Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/inlet-liner-deactivation/deactivation-4>> (Reproduzido com permissão).

Outro fato que pode ocorrer em injeção no modo *splitless* é a discriminação de massa, que ocorre quando uma amostra vaporizada no *liner* não segue de maneira representativa para a coluna, devido a diferenças de peso molecular entre os compostos da amostra. O cromatograma do topo da Figura 3.10 mostra o que acontece quando a temperatura da porta de injeção é muito baixa: o composto C22 não ganha energia suficiente para vaporizar durante o tempo de *splitless* de 1 minuto. A maioria dos outros hidrocarbonetos não são afetados pela diferença de temperatura. De fato, as zonas são as mesmas para C8 a C16 em ambos os cromatogramas, mas é evidente que a temperatura de 200°C dá muito melhores recuperações para os compostos mais pesados do que a de 120°C.

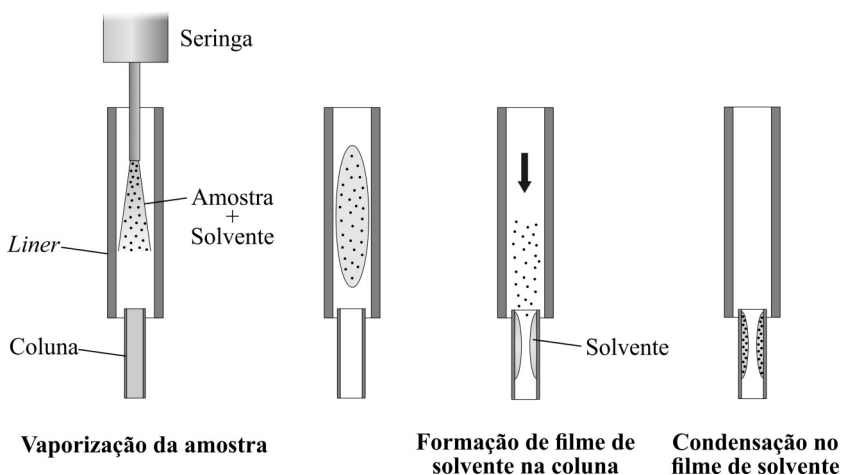
Figura 3.10 - Discriminação de massa



Fonte: Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/injection-temperature>> (Reproduzido com permissão).

Na injeção no modo *splitless*, podemos obter picos mais estreitos utilizando o efeito do solvente. Se a amostra vaporizada for distribuída ao longo da coluna, haverá uma perda de eficiência, ocasionando picos alargados. Entretanto, esse problema pode ser contornado por condensação do solvente em uma estreita faixa na porção inicial da coluna. Isso pode ocorrer se a temperatura da coluna for 10°C abaixo do ponto de ebulição da amostra. Se possível, deve-se utilizar uma amostra de solvente com um ponto de ebulição de pelo menos 25°C inferior ao do componente da amostra mais volátil (ROOD, 2007). Na Figura 3.11, podemos observar a formação de filme do solvente e a coleta do analito na porção inicial da coluna. Percebe-se que o efeito do solvente será efetivo apenas se o solvente for mais volátil que os constituintes.

Figura 3.11 - Efeito do solvente

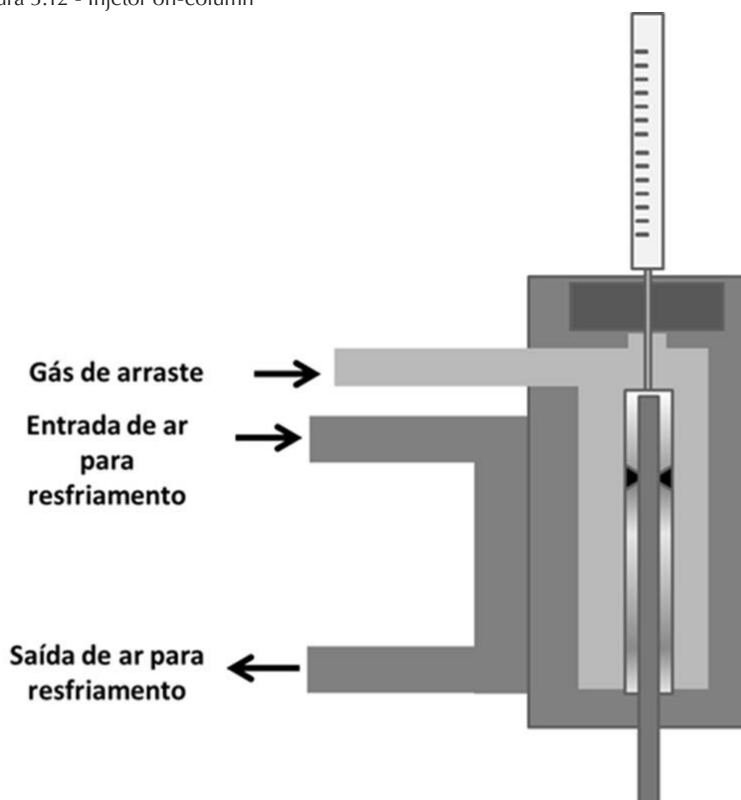


Fonte: Elaborada pelos autores.

Injeção *cool on-column*

A injeção de amostra diretamente na coluna a frio é vantajosa, particularmente, para amostras de alta massa molecular, tendo em vista que a amostra é depositada diretamente na coluna, aumentando-se, assim, a reprodutibilidade, devido à baixa ou inexistente discriminação e decomposição da amostra (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000). A injeção na coluna a frio é pouco utilizada para a análise de matrizes complexas, pois as substâncias de maior ponto de ebulição tendem a se acumular na coluna e podem gerar artefatos após algumas injeções (NEY; TORRES, 2004). Nesse tipo de injeção, a amostra é injetada diretamente na coluna; em seguida, um sistema de resfriamento é colocado em torno do injetador para que as amostras possam ser injetadas a baixas temperaturas (Figura 3.12).

Figura 3.12 - Injetor on-column



Fonte: Elaborada pelos autores.

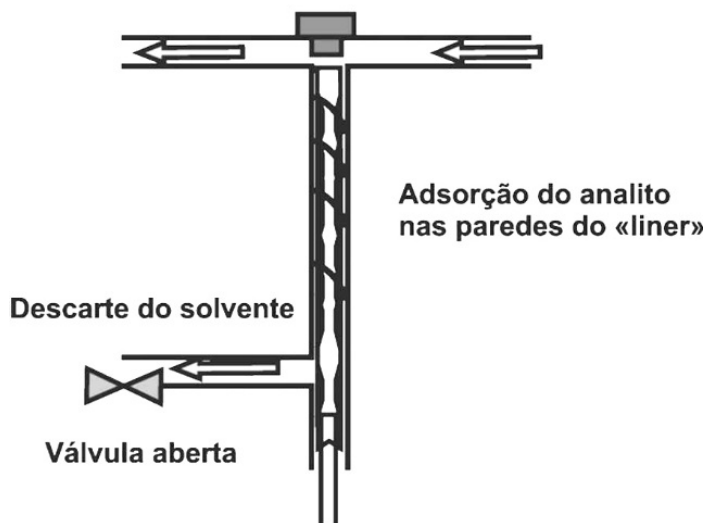
Injeção PTV

O injetor com temperatura programável (PTV) é uma combinação do injetor *split/splitless* com um sistema que o envolve e pode ser removível. Esse sistema consiste de uma manta isolante equipada com um mecanismo de aquecimento (cartucho de aquecimento) e resfriamento (circulação de gás frio). Um injetor de PTV pode ser muito útil como solução para um número distinto de tipos de amostras. Pode ser utilizado para concentrar porções de uma

amostra, permitindo injeções de volumes maiores do que uma coluna analítica normalmente aceita. Pode ainda ser usado como um injetor de grande volume para amostras que contenham pesados componentes ou partículas. O PTV é construído com um injetor de baixa densidade, permitindo que ele seja aquecido com precisão e controle a taxas de até $14,5^{\circ}\text{C}$ por segundo.

No modo de injeção com programação de temperatura, injeta-se de $1\text{-}10\mu\text{L}$ da amostra. O analito fica adsorvido no *liner* ou em um material adsorvente, e o solvente é descartado. Então, o analito é transferido para a coluna por uma programação de temperatura (Figura 3.13 - Injetor PTV):

Figura 3.13 - Injetor PTV



Fonte: Elaborada pelos autores.

Injeção LVI

Injeção de grandes volumes (LVI) é um pré-requisito da análise moderna em cromatografia gasosa (CG), especialmente quando componentes de amostra traço têm que ser determinados em níveis muito baixos de concentração. A injeção de maior volume aumenta a sensibilidade, reduz, ou até mesmo elimina, a necessidade de passos de concentração do extrato. Além disso, um grande volume de injeção pode servir como uma interface para a ligação em linha de CG com uma etapa de preparação da amostra, além de dar uma grande redução na preparação e tratamento de amostras.

A injeção LVI foi usada inicialmente em 1985 (GROB; KARRER; RIEKKOLA, 1985). Para trabalhar com esse método, é importante realizar um *clean up* eficiente da amostra, pois também há risco de inserir maiores quantidades de contaminantes no sistema cromatográfico. Como exemplo de aplicação, temos a análise de HPAs em emissões de motores a diesel (SOUZA; CORRÊA, 2015).

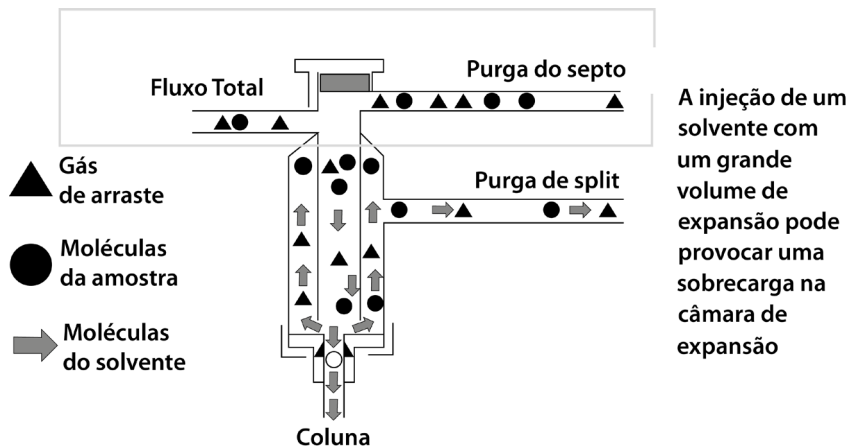
Injeção *headspace*

Normalmente, a injeção no modo *headspace* é utilizada para processos em que a amostra possa contaminar o sistema de injeção. Por exemplo, a presença de ácidos graxos voláteis em biorreatores pode indicar a presença de micro-organismos. A análise de ácidos graxos, usualmente, é realizada por titulação, cromatografia líquida e cromatografia de íons, porém a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama é mais sensível, embora possa levar à contaminação do detector e a contaminações em virtude das técnicas utilizadas, como a extração por solvente. Técnicas de injeção por *headspace* tradicional ou *headspace* por SPME são técnicas eficientes e dispensam o uso de solventes de extração (CRUWYS et al., 2002).

Câmara de vaporização (*liner*)

A câmara de vaporização, comumente chamada de *liner*, tem uma importante função na vaporização das amostras. A primeira pergunta que surge é por que usar um *liner*. A resposta é simples: o *liner* elimina o contato da amostra com o metal, promovendo um aquecimento mais uniforme da amostra. Um *liner* ideal deve fornecer condições ideais para a vaporização da amostra e ser inerte o suficiente para não interagir com a amostra a ser analisada. Além disso, deve ter um volume suficiente para conter a amostra após a expansão, sem extravasar. Caso haja extravasamento do *liner*, o excesso pode se acumular na entrada do gás de arraste, podendo gerar picos fantasmas (Figura 3.14):

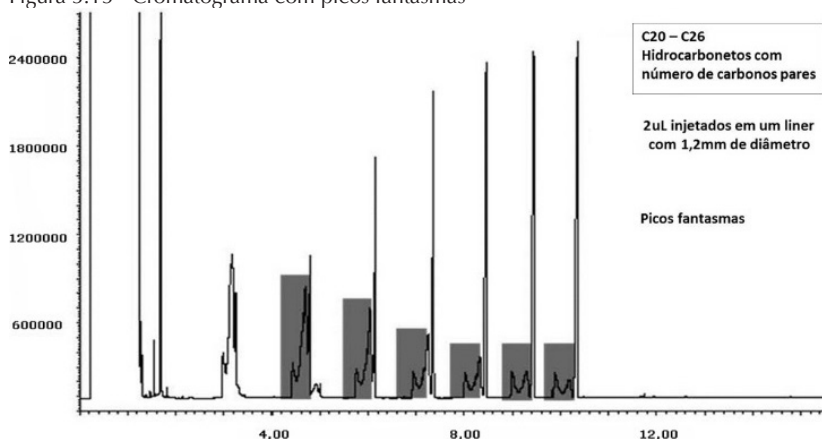
Figura 3.14 - Acúmulo de amostra por extravasamento do *liner*



Fonte: Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/flashback/flashback---cause>> (Reproduzido com permissão).

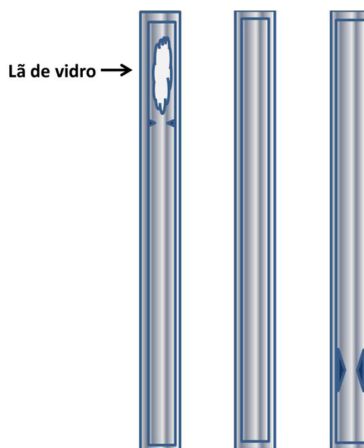
Uma escolha do volume do *liner* deve ser realizada para evitar os picos fantasmas (Figura 3.15):

Figura 3.15 - Cromatograma com picos fantasmas



Fonte: Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/flashback/flashback--ghost-peaks>> (Reproduzido com permissão).

Outro fator importante na escolha do *liner* diz respeito à polaridade dos compostos a serem analisados. Para compostos altamente polares, um *liner* inerte previne a perda de analito por adsorção. Na Figura 3.16, temos três representações de *liner*:

Figura 3.16 - *Liners* para injeção com lã de vidro, no modo *split* e no modo *splitless*

Fonte: Elaborada pelos autores.

Os principais parâmetros avaliados na escolha do *liner* são:

- O volume do *liner*;
- O diâmetro interno;
- Se o modo de injeção é *split* ou *splitless*;
- Se o *liner* é empacotado ou não empacotado.

O primeiro parâmetro a ser avaliado é o volume do *liner*. Deve-se levar em consideração o volume de vapor que será produzido em seu interior após a expansão, o que depende do tipo de solvente usado no preparo da amostra, da temperatura de injeção e da pressão no interior do *liner*. O volume deve ser grande o suficiente para acondicionar a amostra sem extrapolação para fora do *liner*. Se o diâmetro do *liner* for muito pequeno, a amostra irá expandir para fora do *liner*, ocasionando perda de amostra pela purga do septo e pela divisão de fluxo. Isso pode ser observado quando surgem picos cromatográficos com cauda e pobre reprodutibilidade da área do pico. O volume de vapor da amostra pode ser calculado por:

$$\text{Volume de vapor (mL)} = \frac{\left(V \times \frac{D}{MM}\right) \times R \times T \times 1.000.000}{P_a + P_i} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Em que:

V = volume da amostra em ml;

D = densidade do solvente (g/ml a 20°C);

MM = massa molar do solvente (Da);

R = constante dos gases de Boltzman (8,314462 m³ Pa/mol.K);

T = temperatura do injetor;

P_a = pressão atmosférica (Pa);

P_i = pressão no injetor (Pa).

Por exemplo, para a injeção de 1µL de hexano, a 300°C e 66KPa, teríamos um volume de vapor de:

$$\text{Volume de vapor (ml)} = \frac{\left(0,001 \times \frac{0,659}{86}\right) \times 8,314462 \times 573 \times 1.000.000}{101325 + 66000}$$

$$\text{Volume de vapor (ml)} = 0,22 \text{ mL ou } 220 \mu\text{L}$$

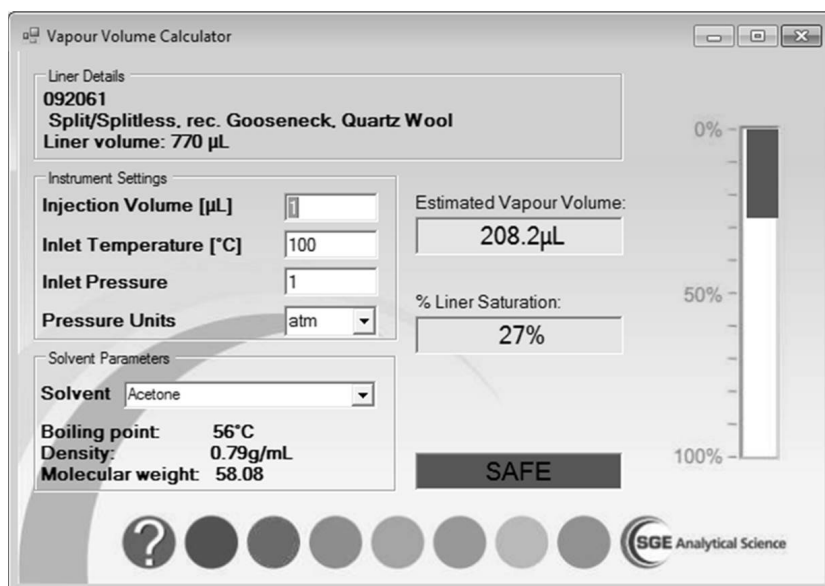
Como regra geral, o volume de vapor não deve exceder 80% do volume do *liner*. Portanto, para o uso de um *liner TRACE 1300/1310 and Agilent 2,3mm I.D. x 78,5mm*, o volume do *liner* será:

$$\text{Volume do liner (mL)} = \frac{\pi \times D^2 \times h}{4} = \frac{3,14 \times 2,3^2 \times 78,5 \text{ mm}^3 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \times 1 \text{ mL}}{4 \times 1 \text{ mm}^3 \times 1 \text{ cm}^3}$$

$$\frac{3,14 \times 2,3^2 \times 78,5 \text{ mm}^3 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \times 1 \text{ mL}}{4 \times 1 \text{ mm}^3 \times 1 \text{ cm}^3}$$

$$\text{Volume do liner (mL)} = 0,32 \text{ mL}$$

Alguns fabricantes de *liner* distribuem *softwares* gratuitos em que o analista pode simular vários tipos de solventes, vários tipos de *liner* e várias condições de injeção (Figura 3.17):

Figura 3.17 - Software para seleção de *liner*-SGE

Fonte: Disponível em: <<http://www.sge.com/products/gc-lc-supplies/gc-supplies/gc-inlet-liners3>> (Reproduzido com permissão).

A escolha do tipo de *liner* depende do volume a ser injetado, das propriedades físico-químicas do solvente, do estado físico da amostra e do tipo de fibra injetada.

A análise de compostos termolábeis é desaconselhada devido à degradação causada no injetor. Um controle rigoroso nas condições de injeção e de adição de aditivos pode, entretanto, tornar possível esse tipo de injeção. Por exemplo, utilizando um *liner standard HP double tapered splitless liner*, é possível analisar a fenilureia. Já em injeção *splitless* convencional, há a formação extensa e irreproduzível de isocianatos e aminas. Apesar disso, um controle cuidadoso das condições de funcionamento, como da temperatura de entrada, da pressão e da presença de aditivos químicos adequados (ácido acético, aminas de baixo peso molecular em massa, anidridos orgânicos), pode minimizar a decomposição térmica, permitindo a análise direta por GC-MS (GENNARO et al., 2001).

Análise de pesticidas em frutas e legumes, de policloreto de bifenila (PCB) no leite em pó e de PCBs coplanares em peixes pode ser obtida com o uso de injeção PTV com *liner* específico (DAVID et al., 2013). *Liner* inerte rende melhor precisão (repetibilidade) (ZHANG; WANG; LIU, 2015).

Referências bibliográficas

AI, G.; SUN, T.; DONG, X. Evaluation of hydrolysis and alcoholysis reactions in gas chromatography/mass spectrometry inlets. *Journal of Chromatography A*, v. 1356, p. 283-8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24997112>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

BRAGA, E. A. S. et al. Characterization of the fatty acids present in wastewaters from production of biodiesel Tilapia. *Journal of Chemistry*, v. 2015, 2015. 6 p.

CARLIN, M.; DEAN, J. *Forensic applications of gas chromatography*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2013.

CRISTALE, J.; SILVA, F.; MARCHI, M. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclética Química*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 69-78, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/eq/v33n4/v33n4a09.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

CRUWYS, J. et al. Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 945, n. 1-2, p. 195-209, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730101514X>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

DAVID, F. et al. Increasing productivity for the analysis of trace contaminants in food by gas chromatography-mass spectrometry using automated liner exchange, backflushing and heart-cutting. *Journal of Chromatography A*, v. 1313, p. 147-56, 2013. Disponí-

vel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891373>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

ESPAÑA AMÓRTEGUI, J. C.; GUERRERO DALLOS, J. A. Practical aspects in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in exotic fruits. *Food Chemistry*, v. 182, p. 14-22, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615003040>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

ESTEVEZ, Y. et al. Unexpected dimerization of isoprene in a gas chromatography inlet. A study by gas chromatography/mass spectrometry coupling. *Journal of chromatography A*, v. 1331, p. 133-8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485537>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

GENNARO, M. C. et al. New strategies for the determination of phenylurea pesticides by gas chromatography with hot splitless inlet systems. *Journal of Chromatography A*, v. 910, n. 1, p. 79-86, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300011821>>. Acesso em: 19 mar. 2015.

GROB, K.; KARRER, G.; RIEKKOLA, M.-L. On-column injection of large sample volumes using the retention gap technique in capillary gas-cromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 334, p. 129-155, 1985.

HANKEMEIER, T. et al. Optimization of large-volume on-column injection conditions in gas chromatography by monitoring the actual carrier gas flow. *Journal of Chromatography A*, v. 841, n. 1, p. 75-94, 1999.

ITO, H. et al. Development of septum-free injector for gas chromatography and its application to the samples with a high boiling point. *Journal of Chromatography A*, v. 1132, n. 1-2, p. 2569, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901495>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

JENNINGS, W.; SHIBAMOTO, T. *Quantitative analysis of flavor and fragrance volatile by glass capillary column gas chromatography*. New York: Academic Press. 1980.

KAMAL, M. A.; KLEIN, P. Estimation of BTEX in groundwater by using gas chromatography-mass spectrometry. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 17, n. 3, p. 205-8, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J. *Split and splitless injection for quantitative gas chromatography: concepts, processes, practical guidelines, sources of error*. 4 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

KLEE, M.; PACKARD, H. *GC inlets: an introduction*. 1990. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=80043&indexSearch=ID>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

LAY, J. J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Mathematical model for methane production from landfill bioreactor. *Journal of Environmental Engineer*, v. 124, n. 8, p. 730-736, 1998.

LUONG, J. et al. Ultra-trace level analysis of morpholine, cyclohexylamine, and diethylaminoethanol in steam condensate by gas chromatography with multi-mode inlet, and flame ionization detection. *Journal of chromatography A*, v. 1229, p. 223-9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325017>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography: techniques in analytical chemistry*. New York : John Wiley & Sons, 1997.

MILHOME, M. A. L. et al. Influence the use of pesticides in the quality of surface and groundwater located in irrigated areas of Jaguaribe, Ceará, Brazil. *International Journal Environmental Resource*, v. 9, n. 1, p. 255-262, 2015.

NEY, J. G.; TORRES, A. G. Análise de ácidos graxos não-esterificados de plasma humano por cromatografia gasosa capilar com injeção sem divisão de fluxo. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 561-566, 2004.

PAZ, M. et al. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: peel, fruit and commercial pulp. *Food Control.*, v. 54, p. 374-382, 2015.

PROBLEMS, M. S. *How to minimize septum problems in GC*. 2015. Disponível em: <<http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/36134-How-to-Minimize-Septum-Problems-in-GC/>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

RESTEK. *A technical guide for static headspace analysis using GC*. 2000. 20 p.

ROOD, D. *The troubleshooting and maintenance guide for gas chromatographers*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 370-379, 2000.

SELIM, M. T.; EL-SAEID, M. H.; DOSSARI, I. M. A. Multi-residues analysis of pesticides using gas chromatography mass spectrometry: I- leafy vegetables. *Research Journal of Environmental Sciences*, v. 5, n. 3, p. 248-258, 2011.

SOUZA, C. V.; CORRÊA, S. M. Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions in diesel exhaust using gas chromatography-mass spectrometry with programmed temperature vaporization and large volume injection. *Atmospheric Environment*, v. 103, p. 222-230, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231014009959>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

SOUZA, R. R. Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. *Química Nova*, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 1453-1458, 2012.

SPLIT vs splitless. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/inlet-liner-deactivation/deactivation-4>>. Acesso em: 16 mar. 2015.

STEPANOV, I. et al. Analysis of 23 polycyclic aromatic hydrocarbons in smokeless tobacco by gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 23, n. 1, p. 66-73, 2010.

WAHL, J. H.; BOLZ, C. D.; WAHL, K. L. *Investigating solvent purity using comprehensive gas chromatography: a study of acetones*. LCGC Europe, v. 23, n. 4, Apr. 2010.

WALGRAEVE, C. et al. Quantification of PAHs and oxy-PAHs on airborne particulate matter in Chiang Mai, Thailand, using gas chromatography high resolution mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, v. 107, p. 262-272, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231015001703>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

YUAN, K. et al. Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in sediments by gas chromatography-mass spectrometry using subcritical. . . *Analytica Chimica Acta*, v. 866, p. 41-7, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732691>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

ZHANG, H.; WANG, Z.; LIU, O. Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 5, n. 4, p. 223-230, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915000179>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

Sites:

CHROMATOGRAPHY. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-gc-inlet-maintenancehave-you-really-heard-it-all>>. Acesso em: 30 ago 2015.

TRAJANSCIMED. Disponível em: <<https://www.trajanscimed.com/pages/training-gc-injection>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

SGE. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/inlet-liner-deactivation/deactivation-4>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

SGE. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/injection-temperature>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

SGE. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/flashback/flashback---cause>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

SGE. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/injection/flashback/flashback---ghost-peaks>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

SGE. Disponível em: <<http://www.sge.com/products/gc-lc-supplies/gc-supplies/gc-inlet-liners3>>. Acesso em: 29 ago. 2015.

FASES ESTACIONÁRIAS E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Vítor Paulo Andrade da Silva

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

Ari Clecius Alves de Lima

Ronaldo Ferreira do Nascimento

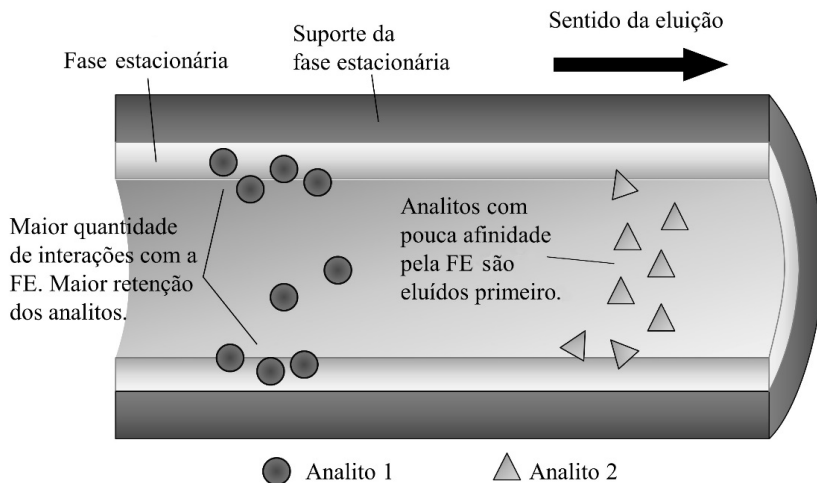
A fase estacionária é a principal responsável pela separação dos analitos em uma análise cromatográfica (ZEEUW; LUONG, 2002). Ela fica contida no interior de um tubo longo, que pode ser constituído de aço inox, vidro, sílica fundida, alumínio, PTFE etc. Este conjunto é denominado coluna cromatográfica.

O fenômeno de separação ocorre devido aos processos diferenciados de transferência de massa dos analitos entre fase estacionária e fase móvel. Ou seja, cada analito interage de maneira particular com a fase estacionária, influenciado por características físico-químicas, como pressão de vapor e forças intermoleculares (analito/fase estacionária).

Na Figura 4.1, pode ser observada a separação de dois analitos influenciada pela diferença na magnitude da interação entre eles e a fase estacionária (FE). O analito 1, que possui maior afixação

nidade pela fase estacionária, apresenta uma distribuição predominante nesta. Isso retarda seu deslocamento pela coluna. Já o analito 2 possui pouca afinidade pela fase estacionária, o que faz com que sua distribuição seja favorável à fase móvel. Dessa forma, o analito 2 é eluído mais rapidamente. À medida que os analitos migram no interior da coluna, deslocados pelo gás de arraste, ocorre a separação entre eles.

Figura 4.1 - Representação de uma separação cromatográfica, em coluna capilar, devido à interação diferenciada entre analitos e fase estacionária (FE)



Fonte: Elaborada pelos autores.

A capacidade da coluna cromatográfica em separar (“diferenciar”) determinados analitos pode ser chamada de seletividade, e esta é determinada pelas interações físico-químicas dos analitos com a fase estacionária. Em um contexto mais amplo, a separação adequada dos analitos no método cromatográfico (resolução) está também atrelada a outros fatores, como programação de temperatura do forno e comprimento da coluna, o que será explorado no decorrer do capítulo.

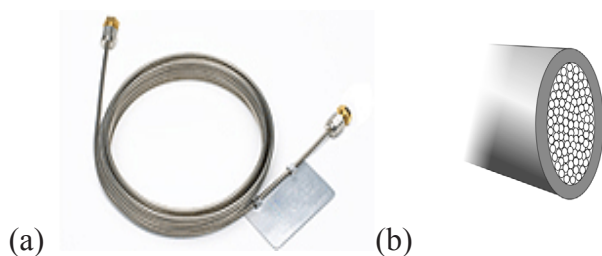
O termo que expressa a tendência do analito em se distribuir entre a fase móvel e a estacionária é a *constante de distribuição* (K_c) (Equação 1.1). O valor de K_c é um parâmetro termodinâmico, que depende da natureza química da fase estacionária e é fortemente influenciado pela temperatura (MCNAIR; MILLER, 2009).

A forma como a fase estacionária está distribuída no interior da coluna pode classificá-la em recheada ou capilar, como veremos nas próximas seções.

Colunas recheadas

As colunas recheadas (ou empacotadas) são preenchidas com partículas uniformes e finamente divididas, geralmente terra diatomácea (sílica). Esse material pode ser a própria fase estacionária ou pode servir de suporte para uma fase estacionária líquida não volátil (Figura 4.2). Com frequência, a sílica é tratada quimicamente em um processo chamado de silanização, que substitui grupos hidroxilas presentes por outros grupos. A silanização pode também auxiliar na imobilização do polímero líquido não volátil, que funcionará como fase estacionária na superfície do suporte, tornando esta mais estável em temperaturas mais altas.

Figura 4.2 - Coluna recheada ou empacotada: (a) foto; (b) corte transversal



Fonte: (a) Agilent Technologies (2015a) (Reproduzido com permissão); (b) Elaborada pelos autores.

A uniformidade entre o tamanho das partículas propicia um fluxo mais uniforme do eluato, favorecendo o aumento da resolução, uma vez que partículas com dimensões variadas contribuem para que alguns fluxos dentro da coluna sejam mais longos do que outros. Ou seja, com partículas de tamanho mais uniforme, o efeito dos múltiplos caminhos é reduzido (Ver seção “Equação de Golay e eficiência de coluna capilar em CG”).

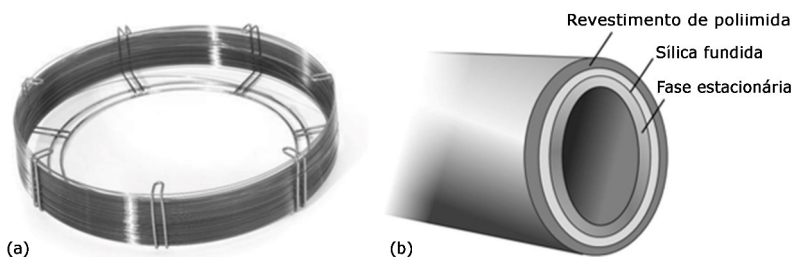
As colunas empacotadas são, geralmente, confeccionadas com aço inoxidável ou vidro. Na análise de substâncias corrosivas, ou quando a fase estacionária apresenta tendência a reagir com os materiais citados acima, utilizam-se colunas fabricadas ou revestidas internamente com o PTFE (nome comercial Teflon®). A limitação do PTFE é que só pode ser empregado em análises com temperatura inferior a 200°C.

Colunas recheadas eram muito utilizadas em análises cromatográficas no passado. Atualmente, elas têm sido substituídas pelas capilares, que são mais eficientes e mais rápidas (SKOOG et al., 2008).

Colunas capilares

As colunas capilares (Figura 4.3) são empregadas na maioria das análises atualmente. Elas proporcionam melhor resolução, maior sensibilidade e menor tempo de análise, quando comparadas com as recheadas. Podem ser fabricadas com vidro, aço inoxidável ou sílica fundida (SiO_2), com o recobrimento de um material protetor, geralmente poliimida, um polímero capaz de resistir a até 350°C (Figura 4.3).

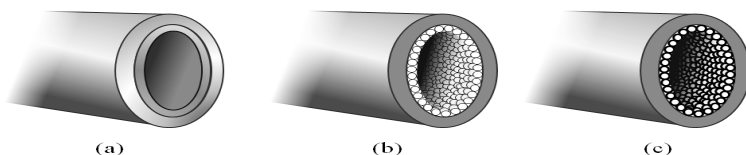
Figura 4.3 - Coluna capilar: (a) foto; (b) corte transversal



Fonte: (a) Agilent Technologies (2015a) (Reproduzido com permissão); (b) Elaborada pelos autores.

Vários tipos de colunas capilares estão disponíveis comercialmente. Podem ser dos tipos: coluna capilar com parede recoberta (WCOT, do inglês *wall coated open tube*); coluna capilar com fase estacionária ligada à parede (WBOT, do inglês *wall bonded open tube*); coluna capilar com suporte recoberto (SCOT, do inglês *support coated open tube*); e coluna capilar com camada porosa (PLOT, do inglês *porous layer open tube*) (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Corte transversal para tipos de colunas capilares: (a) coluna capilar com parede recoberta (WCOT) ou com fase estacionária ligada quimicamente à parede (WBOT); (b) coluna capilar com camada porosa (PLOT); (c) coluna capilar com suporte recoberto (SCOT)



Fonte: Elaborada pelos autores.

As colunas WCOT possuem um filme da fase estacionária líquida recobrando uniformemente as paredes internas da coluna (Figura 4.4). A espessura desse filme varia de 1 a 5µm. As colunas WBOT são mais avançadas, pois a fase estacionária é imobilizada quimicamente na parede interna da coluna, processo que aumenta sua durabilidade, pois há diminuição significativa da lixiviação por solventes e da volatilização em altas temperaturas. A perda de fase estacionária é denominada sangramento, o qual será discutido com mais detalhes a seguir. Nas colunas PLOT (Figura 4.4), a fase estacionária é constituída de partículas sólidas porosas fixas às paredes internas da coluna. Tais partículas podem ser compostas de zeólitas (peneira molecular), carbono grafitado ligado quimicamente (Carboxen®), polímero poroso, sílica quimicamente ligada ou alumina. Esse tipo de coluna pode ser comumente utilizado na separação de moléculas pequenas, como gases permanentes, hidrocarbonetos leves e compostos sulfurados leves. Nas colunas SCOT (Figura 4.4), uma fase estacionária líquida recobre o material particulado adsorvente. Podem ser usadas na análise de isômeros do xileno, analitos aromáticos, olefinas e separações por ponto de ebulição.

As principais diferenças entre as colunas recheadas e capilares para cromatografia gasosa podem ser observadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Principais diferenças entre as colunas recheadas e capilares

| Parâmetro | Recheada | Capilar |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|
| Comprimento (m) | 1 - 6 | 10 - 100 |
| Diâmetro interno (mm) | 1 - 4 | 0,15 - 0,75 |
| Eficiência (prato/metro) | 500 - 1.000 | 1.000 - 4.000 |
| Quantidade de amostra (ng) | 10 - 1.000 | 10 - 10 ⁶ |
| Velocidade relativa de análise | Rápida | Lenta |
| Estabilidade química | Menos estável | Mais estável |

Tipos de fases estacionárias

A fase estacionária pode ser um polímero líquido não volátil (cromatografia gás-líquido) ou um material sólido poroso (cromatografia gás-sólido). Na Tabela 4.2, podem ser observados os aspectos gerais do mecanismo de separação de acordo com o tipo de fase estacionária para cromatografia gás-líquido e gás-sólido.

Tabela 4.2 - Mecanismo geral de separação da fase estacionária de acordo com o método cromatográfico

| Método cromatográfico | Fase estacionária | Mecanismo de separação |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Gás-líquido | Polímero líquido | Partição (absorção) |
| Gás-sólido | Sólido | Adsorção |

Fonte: Harris (2010).

Fase estacionária sólida em cromatografia gás-sólido (CGS)

Esse tipo de fase estacionária destina-se à separação de solutos muito voláteis, principalmente gases. É constituída de pequenas partículas porosas aderidas à parede interna da tubagem capilar por um agente aglutinante ou por meios semelhantes (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015d). São conhecidas como colunas PLOT. A separação ocorre com base nas diferentes propriedades de adsorção. Na Tabela 4.5, podem ser observados os tipos de adsorventes utilizados em fases estacionárias sólidas.

Tabela 4.5 - Tipos de materiais adsorventes utilizados em fases estacionárias sólidas

| Fase estacionária | Aplicação típica |
|--|--|
| Adsorvente de alta seletividade | Alta retenção de hidrocarbonetos oxigenados (índice de retenção para metanol > 1400). Útil para os álcoois, cetonas, éteres e gasolina, diesel e série de hidrocarbonetos de C ₁ a C ₄ . |
| Óxido de alumínio desativado com KCl | Fase de alumina menos polar. Menor retenção de olefinas comparado a parafinas. Hidrocarbonetos isômeros de C ₁ a C ₈ . Boa resolução para dienos, especialmente propadieno e butadieno a partir de uma série de etileno e propileno. |
| Óxido de alumínio desativado com KCl | Análise de hidrocarbonetos leves |
| Óxido de alumínio desativado com NaSO ₄ | Isômeros de hidrocarbonetos leves (C ₁ a C ₈). Resolução de acetileno em butano e propileno em isobutano. |
| Sílica suportada ligada | Hidrocarbonetos de C ₁ a C ₁₂ , CO ₂ , traços de sulfetos, hidretos gasosos, gases inorgânicos, carbonos alogenados, SF ₈ , separação de oxigênio/nitrogênio a -80°C. |
| Ligado, camada de carbono monolítico | Hidrocarbonetos de C ₁ a C ₁₂ , CO ₂ , ar/CO, traços de acetileno em etileno, metano. |
| Zeólita (peneira molecular 5Å) | Gases nobres e permanentes. |
| Zeólita (peneira molecular 5Å) | Gases nobres e permanentes. Filmes espessos e finos disponíveis. Filme espesso resolve argônio e oxigênio a 35°C. |
| Poliestireno-divinilbenzeno | Isômeros de C ₁ a C ₃ , alcanos até C ₁₂ , CO ₂ , metano, ar/CO, água, compostos oxigenados, sulfurados, solventes. |
| Divinilbenzenohomopolímero poroso | Polaridade entre Porapak-Q e Porapak-N |
| Divinilbenzeno/etileno | Mais polar que HP-PLOT e GS-Q. Hidrocarbonetos de C ₁ a C ₇ , CO ₂ , metano, ar/CO, água, aminas, solventes, álcoois, cetonas, aldeídos. |

Fonte: Supelco (2015a) e Agilent Technologies (2015e).

Informações adicionais e mais detalhadas a respeito dos tipos e aplicações de colunas PLOT podem ser obtidas em *websites* de fabricantes (Agilent J&W, Supelco, SGE, Phenomenex, Restek, Thermo). Tenax®, HayeSep®, Porapak® e Chromosorb® são algumas marcas registradas de polímeros porosos adsorventes desenvolvidos para separação de gases e analitos muito voláteis. Outras marcas de adsorventes são Carbotrap® e Carbopack™ (baseados em carbono negro grafitado) e Carboxen® e Carbosieve® (polímero esférico de carbono grafitado).

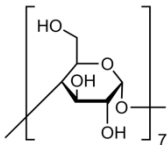
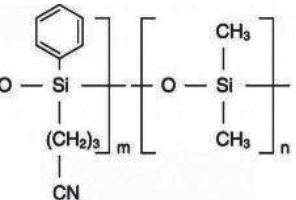
Deve-se ressaltar que esses tipos de polímero apresentam variedades de classificações secundárias baseadas em tamanho de partículas e tamanho de poros (SUPELCO, 2015b).

Fase estacionária líquida em cromatografia gás-líquido (CGL)

Como fases líquidas, podemos citar o dimetilpolissiloxano e o polietilenoglicol. Nessas fases, há três interações principais com os compostos da amostra: forças de dispersão, momento dipolo e ligação de hidrogênio.

Há inúmeras fases estacionárias disponíveis comercialmente, com características que vão de apolar até polar. A polaridade da fase estacionária é determinada pela polaridade dos grupos substituintes e suas quantidades relativas (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015b). A Tabela 4.3 relaciona algumas fases em ordem crescente de polaridade.

Tabela 4.3 - Relação das principais fases estacionárias em ordem crescente de polaridade e suas estruturas moleculares

| | | |
|-------------------------|---|--|
| Baixa Polaridade | 100% dimetilpolissiloxano | $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{100\%}$ |
| | 5% fenil-metilpolissiloxano | $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{95\%} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{CH}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_{5\%}$ |
| | 35% fenil-metilpolissiloxano | $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{65\%} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_{35\%}$ |
| | β-ciclodextrina em (35%-fenil)-metilpolissiloxano |  |
| | 50% fenil - 50% metilpolissiloxano | $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{50\%} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{O}-\text{Si} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_{50\%}$ |
| | 6% cianopropilfenil - 94% metilpolissiloxano |  |

| | | |
|-----------------------------|---|--|
| Média Polaridade | 14% cianopropil-fenil - 86% metilpolissiloxano | |
| | 30% heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-t-butil dimetilsilil)-β-ciclodextrina em 14% cianopropil-fenil-metilpolissiloxano | |
| | (50% Cianopropilfenil)-metilpolissiloxano | |
| | (35% trifluoropropil)-metilpolissiloxano | |
| | (50% Cianopropil)-metilpolissiloxano | |
| Alta Polaridade | Polietilenoglicol | |

Fonte: Agilent Technologies (2015b) (Figura adaptada, reproduzida com permissão).

Os fabricantes de coluna para cromatografia utilizam sua própria denominação, ou código, para se referir a um tipo de fase estacionária. Ou seja, há diversas referências de colunas cromatográficas para uma mesma fase estacionária.

A Tabela 4.4 relaciona os tipos de fases estacionárias mais comuns e o nome comercial (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015c) similar de acordo com o fabricante.

Tabela 4.4 - Fase estacionária e nomes comerciais similares conforme o fabricante

| Fase estacionária | Nomes comerciais similares conforme o fabricante |
|---|--|
| Dimetilpolisiloxano | HP-1, DB-1, SPB-1, Rtx-1, BP-1, OV-1, OV-101, 007-1(MS), SP-2100, SE-30, ZB-1, AT-1, MDN-1 |
| 50% fenil - 50% metilpolisiloxano | DB-17, Rxi-17Sil MS, Rtx-50, 007-17, SP-2250, SPB-50, BPX-50, SPB-17, AT-50 |
| 3-cianopropil polisiloxano | DB-23, SP-2330, Rtx-2330, 007-23, AT-Silar, BPX-70, SP-2340 |
| Trifluoropropilmetilpolysilicone | DB-200, DB-210, Rtx-200, SP-2401 |
| 50% cianopropil - 50% fenilmetilsilicone | DB-225, SP-2330, Rtx-225, BP-225, OV-225, 007-225, AT-225 |
| Polietilenoglicol (massa molecular média de 950-1.050) | DB-WAX, HP-20M, SUPELCOWAX 10, CP-WAX 52 CB, SUPEROX II, CB-WAX, Stabilwax, BP-20, 007-CW, Carbowax, HP-INNOWax, Rtx-WAX, ZB-WAX |
| 75% fenil - 25% metilpolisiloxano | DB-17, Rxi-17Sil MS, Rtx-50, 007-17, SP-2250, SPB-50, BPX-50, SPB-17, AT-50 |
| 25% fenil - 25% cianopropilmetilsilicone | DB-225ms, SP-2330, Rtx-225, BP-225, OV-225, 007-225, AT-225 |
| Polietilenoglicol TPA (Carbowax ácido tereftálico 20M) | Stabilwax-DA, HP-FFAP, Nukol, 007-FFAP, BP21, CP-Wax 58 (FFAP) CB, AT- 1000, OV-351, CP-FFAP-CB, DB-FFAP |
| 5% fenil - 95% metilpolisiloxano | DB-5, SPB-5, Rtx-5, BP-5, OV-5, 007-2(MPS-5), SE-52, SE-54, XTI-5, PTE-5, ZB-5, AT-5, MDN-5, ZB-5 |

| Fase estacionária | Nomes comerciais similares conforme o fabricante |
|--|--|
| 5% fenil - 95% metilpolisiloxano (ms) | DB-5ms, Rtx-5ms, Rxi-5ms, Rxi-5Sil MS, PTE-5, BPX-5, AT-5ms, ZB-5ms, ZB-5MSi, SLB-5ms, Equity-5 |
| 25% fenil - 75% metilpolisiloxano | DB-35, Rtx-35, Rtx-35ms, Rxi-35Sil MS, SPB-35, AT-35, Sup-Herb, MDN-35, BPX-35, ZB-35, ZB-35ht |
| 20% fenil - 80% dimetilpolisiloxano | DB-35, Rtx-35, Rtx-35ms, Rxi-35Sil MS, SPB-35, AT-35, Sup-Herb, MDN-35, BPX-35, ZB-35, ZB-35ht |
| Polietilenoglicol & diepóxido estereificado com ácido nitroretfálico | DB-FFAP, HP-FFAP, Stabilwax-DA, HP-FFAP, Nukol, 007-FFAP, BP21, CP-Wax 58 (FFAP) CB, AT - 1000, OV-351, CP-FFAP-CB |
| 1% vinil - 5% fenilmetilpolisiloxano | DB-5, SPB-5, Rtx-5, BP-5, OV-5, 007-2(MPS-5), SE-52, SE-54, XTI-5, PTE-5, ZB-5, AT-5, MDN-5, ZB-5 |
| 35% fenil - 65% dimetilvinilsiloxano | DB-35, Rtx-35, Rtx-35ms, Rxi-35Sil MS, SPB-35, AT-35, Sup-Herb, MDN-35, BPX-35, ZB-35, ZB-35ht |
| 6% cianopropilfenil - 94% dimetilpolisiloxano | DB-624, DB-1301, AT-624, Rtx-624, PE-624, 007-624, 007-502, CP-624, ZB-624, VF-624ms, Rtx-1301, PE-1301 |
| Divinilbenzeno-etilenoglicol-dimetacrilato | DB-1701, SPB-1701, CP-Sil 19 CB, Rtx-1701, BP-10, OV-1701, 007-1701, ZB-1701 |

Fonte: Agilent Technologies (2015c).

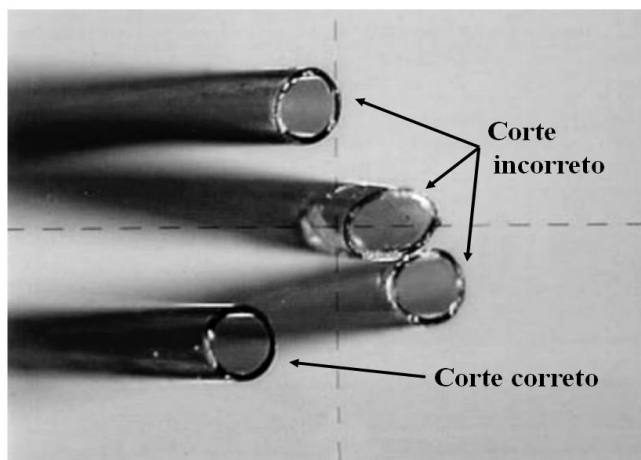
Condições operacionais de uma coluna

Para uma coluna cromatográfica operar em condições satisfatórias, ela deve estar condicionada, bem instalada no forno do cromatógrafo e operar em limites de temperaturas recomendadas ao tipo de fase estacionária.

Para a instalação da coluna, destacamos alguns passos importantes que devem ser seguidos (AGILENT TECHNOLOGIES, 2011a):

1. A coluna deve ser fixada em local próprio, dentro do forno. Deve ser averiguado se o tubo não está tocando nas paredes do mesmo. Com a vibração da coluna no interior do forno, causada principalmente pelo sistema de ventilação, o ponto de contato pode desgastar a coluna. Isso pode fazer com que haja uma ruptura nesses pontos de desgaste, uma vez que a poliimida fica enfraquecida nessas áreas (ROOD, 2007).
2. Curvas acentuadas devem ser evitadas, pois isso gera uma tensão no tubo e pode provocar ruptura.
3. As extremidades da coluna devem ser cortadas em ângulo reto com a parede do tubo (perpendicularmente) e não devem estar irregulares, com rebarbas ou lascadas (Figura 4.5). O corte deve ser feito com uma ferramenta apropriada, como um lápis de ponta de diamante, carbureto ou safira, ou uma cunha de clivagem de cerâmica.

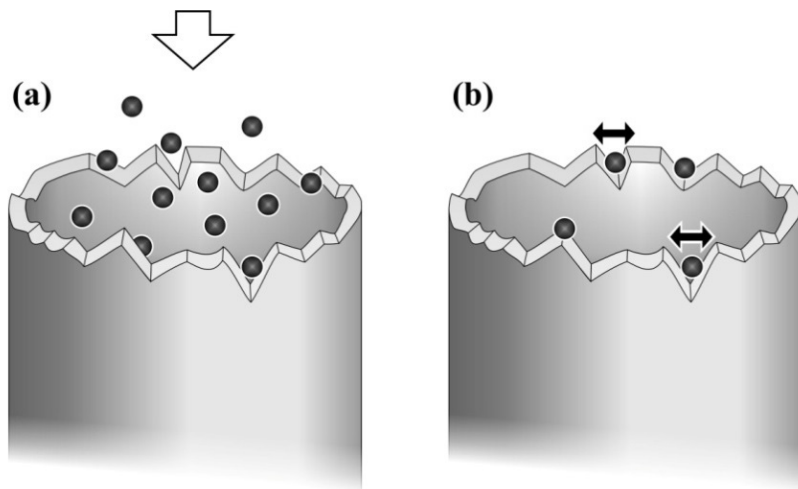
Figura 4.5 - Foto de colunas capilares evidenciando cortes incorretos e corte correto



Fonte: Chromacademy (2013) (Reproduzido com permissão).

O corte incorreto pode resultar em zonas de adsorção para os analitos ou picos com calda (Figura 4.6) (ROOD, 2007).

Figura 4.6 - Representação da extremidade de uma coluna capilar mal cortada. Com a injeção da amostra (a), moléculas podem ficar brevemente retidas nas rebarbas da coluna (b), resultando em picos com caldas



Fonte: Elaborada pelos autores.

O condicionamento é uma etapa crucial para o desempenho da coluna. Essa prática expulsa os contaminantes e minimiza a erraticidade e desvios da linha de base. Colunas novas devem ser condicionadas, pois contêm contaminantes voláteis resultantes do processo de revestimento. Recomenda-se também condicionar colunas usadas que foram armazenadas por algum tempo sem estarem vedadas (AGILENT TECHNOLOGIES, 2011b; SGE, 2012). O condicionamento é realizado passando-se o gás de arraste pela coluna durante um tempo definido, para expulsar o oxigênio, e, em seguida, aquecendo-a a uma temperatura recomendada pelo fabricante, também por um certo período de tempo. O aquecimento da coluna com oxigênio em seu interior ou sem fluxo de gás de arraste promove degradação da fase estacionária.

É possível observar os efeitos do condicionamento pela linha de base do cromatograma, quando esta fica plana ou estabilizada. Fases estacionárias com filmes espessos ou polares, em muitos casos, requerem mais tempo para estabilizar.

Cada tipo de fase estacionária possui limites de temperaturas operacionais, nos quais ela se mantém estável e funcional por extensos períodos. Temperaturas acima do limite superior podem ocasionar danos permanentes à coluna e provocar a perda de desempenho. Abaixo do limite inferior de temperatura, a fase estacionária perde suas propriedades cromatográficas, e os picos tornam-se largos e arredondados. Nesse caso, a coluna não seria danificada. Em ambas as situações, há perda de retenção dos analitos e de eficiência (resolução) (ROOD, 2007).

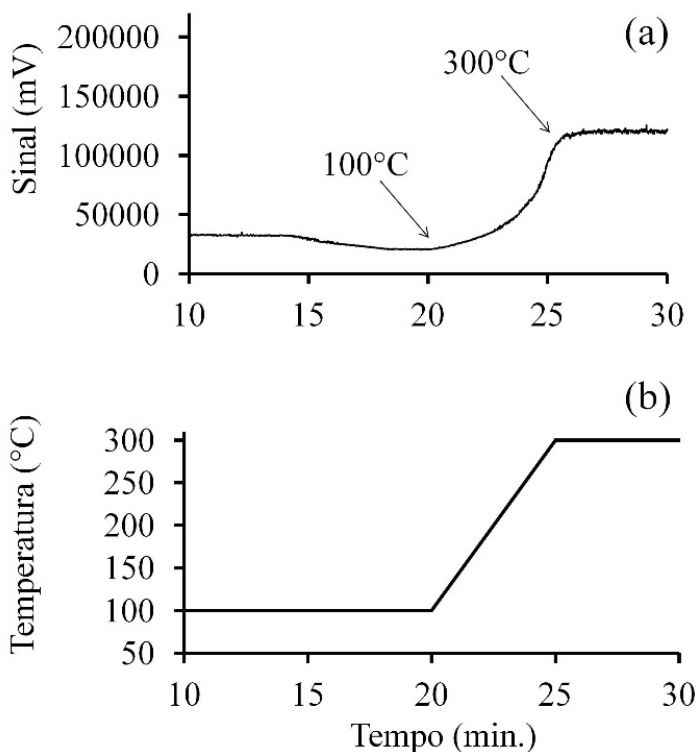
Outras observações a serem consideradas para a instalação adequada de uma coluna cromatográfica envolvem:

- a. checagem da armadilha de purificação nas linhas de gás, para impedir a entrada de impurezas no sistema cromatográfico e remover oxigênio, umidade e/ou hidrocarbonetos;
- b. checagem do septo e *liner*;
- c. checagem de vazamentos;
- d. checagem do fluxo do gás de arraste com fluxômetro.

Sangramento da coluna

Quando ocorrer de o nome comercial da coluna vir seguido por “ms”, significa que a fase estacionária apresenta uma performance melhor, sendo mais estável e podendo suportar limites de temperaturas mais elevados. Diz-se, então, que ela é mais resistente ao sangramento. O sangramento da coluna é a degradação da fase estacionária, causada pela elevada temperatura no forno. Como consequência, os produtos de degradação que são eluídos causam elevação da linha de base no cromatograma (ROOD, 2007). Ainda de acordo com Rood (2007), a degradação da fase estacionária sempre ocorre, independente da origem ou qualidade, e não necessariamente é um sinal de que a coluna está sendo danificada. O perfil de elevação da linha de base pode ser observado na (Figura 4.7).

Figura 4.7 (a) Cromatograma do perfil de sangramento da fase estacionária; (b) programação de temperatura (os dez primeiros minutos de corrida foram omitidos). Condições de análise: Coluna 30m x 0,25mm, Df = 25 μ m. Fase 5% fenil - 95% metilpolisiloxano. Programa de temperatura: 80°C por 10min, 10°C/min até 100°C, permanecendo 5min. 20°C/min até 300°C



Fonte: Elaborada pelos autores.

Observe que a elevação da linha de base acompanha a elevação da temperatura de acordo com a programação de temperatura (Figura 4.7).

Nas colunas “ms”, o filme da fase estacionária apresenta ligações entrecruzadas. As moléculas do polímero são ligadas entre si por ligações carbono-carbono, conferindo maior estabilidade (SKOOG et al., 2008).

Escolha da coluna

Ao escolher a coluna, deve-se observar a fase estacionária, o comprimento, o diâmetro e a espessura do filme da fase estacionária (BARRY; GROB, 2007; SGE, 2015).

A escolha apropriada da fase estacionária é fundamental para o sucesso de uma separação cromatográfica. Como base, deve-se selecionar uma fase que apresente polaridade semelhante à polaridade do(s) analito(s) que se deseja separar. Fases estacionárias não polares separam analitos, predominantemente, por ordem do ponto de ebulição (SGE, 2015). A polaridade da fase estacionária é determinada pela polaridade dos grupos substituintes e suas quantidades relativas (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015f). Assim, em uma coluna de 100% dimetilpolissiloxano, o fenômeno de separação é regido por forças de dispersão, devido à natureza dos grupos metilas substituintes. Em uma coluna de 5% difenil-95% dimetilpolissiloxano, embora o fenômeno dominante de separação ainda sejam as forças dispersivas, há, neste caso, a contribuição de interações de dipolos, devido à presença dos grupos fenil. Considerando uma fase estacionária de dimetilpolissiloxano com substituintes cianopropilfenil, deve-se perceber a possibilidade da presença de ligações de hidrogênio. Colunas com cianopropil, juntamente com as de polietilenoglicol, prestam-se bastante à separação de aldeídos e álcoois.

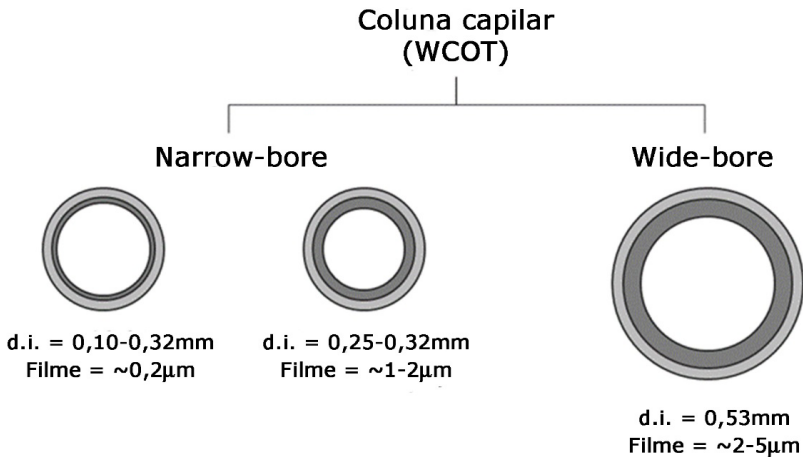
A seletividade também deve ser levada em consideração durante o processo de escolha da coluna, pois são interações específicas que possibilitarão a separação eficiente do(s) analito(s) de interesse em relação a outros compostos estruturalmente similares. De acordo com Rood (2007, p. 41), “Se um composto não apresenta uma característica requerida para uma interação particular, esta interação não irá ocorrer e não haverá influência na separação”. Um exemplo bastante evidente da importância da seletividade são as colunas com fases estacionárias quirais, que têm a capacidade de separar isômeros. Exemplos: misturas racêmicas (fármacos, aminoácidos, lactonas e terpenos); isômeros de

posição (o-, m-, p-xilenos), isômeros geométricos (ésteres metílicos de ácidos graxos *cis-trans*), moléculas responsáveis pelos sabores etc.

O método deve ser iniciado com colunas menores (ex.: 30 metros), devendo-se observar se foi obtida a resolução necessária para a separação. Caso isso não ocorra, deve-se, então, buscar colunas mais longas. O comprimento da coluna influencia no tempo de análise, pois os analitos tendem a permanecer mais tempo dentro da mesma. Com colunas menores, haverá menor demanda de tempo de análise e menor despesa com gases.

Em relação ao diâmetro interno (d.i.), as colunas capilares podem ser classificadas em *narrow-bore* (diâmetro estreito), variando de 0,1 a 0,32mm, e *wide-bore* (diâmetro largo), com 0,53mm. A espessura do filme da fase estacionária também é variável (~0,2 a 0,53mm). No esquema da Figura 4.8, pode ser observada a classificação das colunas capilares e a variação na espessura do filme que as fases estacionárias podem apresentar.

Figura 4.8 - Classificação das colunas capilares e variações na espessura de filme da fase estacionária



Fonte: Elaborada pelos autores.

A eficiência da separação tende a aumentar com a diminuição do diâmetro da coluna, favorecendo um aumento da resolução e da capacidade de análise a nível de traços. Em contrapartida, colunas mais estreitas suportam menor volume de amostra, requerendo detectores mais sensíveis. Colunas com diâmetro maior ($\sim 2 - 5\text{mm}$) têm a vantagem de poder receber maior volume de amostra, entretanto a resolução é um pouco menor do que em colunas mais estreitas.

Filmes de espessura mais fina ($\sim 0,2\mu\text{m}$) minimizam a retenção de compostos com elevado ponto de ebulição e peso molecular. Por possuírem menor volume de fase estacionária, tendem a apresentar menos problemas com sangramento. Entretanto, devido à fina espessura do filme, têm baixa capacidade de amostra ($\leq 1\text{ ng/soluto}$).

Filmes espessos ($\sim 2 - 5\mu\text{m}$) aumentam a carga de amostra que a coluna pode receber (viável para amostras de concentrações elevadas). Também são recomendados quando se deseja separar analitos voláteis, pois estes tendem a permanecer mais tempo retidos, propiciando a separação. O inconveniente, nesse caso, é a maior facilidade de ocorrer sangramento e o aumento significativo do tempo de retenção para compostos com elevado ponto de ebulição.

Muitas separações podem ser perfeitamente viáveis em colunas com 30m de comprimento, diâmetro interno de 0,25mm e espessura de filme igual a 0,25 μm .

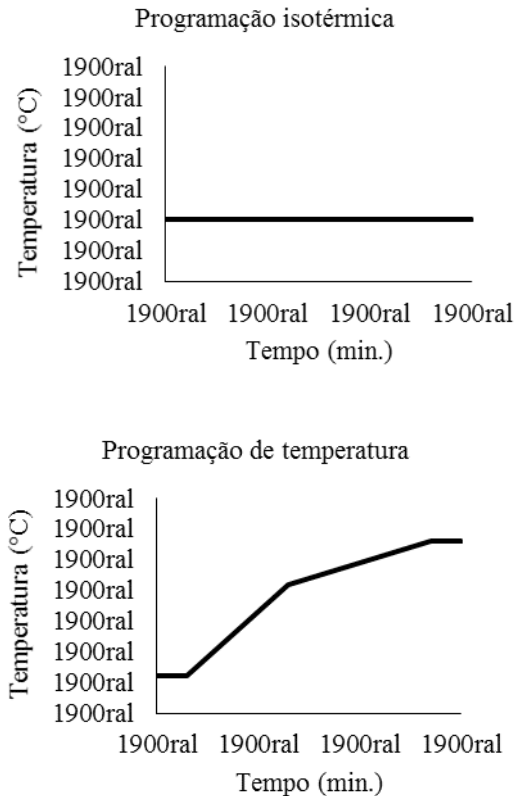
Programação de temperatura

A retenção de um analito é essencialmente dependente da sua natureza química e da fase estacionária. O parâmetro que expressa a tendência do analito em se distribuir entre a fase móvel e a estacionária é a **constante de distribuição** (K_c). Esse, por ser um parâmetro termodinâmico, é influenciado pela temperatura. Assim, os valores de K_c dos analitos podem ser alterados, com o controle da temperatura, para modificar a retenção e melhorar a separação cromatográfica. O modo como a temperatura do forno varia de maneira controlada durante a corrida cromatográfica é chamado de pro-

gramação de temperatura. O controle de temperatura é ajustado no *software* do cromatógrafo.

Quando a temperatura do forno permanece constante durante a corrida, diz-se que o método é isotérmico; quando sofre variação, chama-se de método com temperatura programada. Na Figura 4.9, pode ser observado exemplo dessas duas modalidades.

Figura 4.9 - Exemplo de programação de temperatura isotérmica (a) e temperatura programada (b)



Fonte: Elaborada pelos autores.

Tomando como exemplo a Figura 4.9a, na corrida isotérmica, a temperatura permanece constante a 100°C durante toda a corrida cromatográfica, que tem duração de 30 minutos. Na Figura 4.9b, podemos observar que a temperatura do forno sofre variação: inicialmente, mantém-se constante a 60°C durante 3 minutos; em seguida, aumenta a uma taxa de 15°C por minuto até 230°C, quando a taxa passa a 10°C por minuto até 300°C; por fim, permanece constante a 300°C durante 3 minutos, totalizando 30 minutos de corrida cromatográfica.

Equação de Golay e eficiência de coluna capilar em CG

A eficiência de uma coluna cromatográfica é afetada por uma gama de fatores que podem comprometê-la, conforme as condições da corrida cromatográfica e as características dimensionais da coluna. A falta de eficiência da coluna é prontamente observada pela ocorrência de processos de *alargamento de banda cromatográfica*, caracterizados por deformações na morfologia dos picos cromatográficos e baixas resoluções, visualizadas no cromatograma obtido sob determinadas condições de análise (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG et al., 2008).

Os processos de alargamento de banda afetam a confiabilidade dos resultados analíticos, tendo em vista que a deformação dos picos cromatográficos prejudica a reprodutibilidade das áreas de pico (*sinais analíticos*) e dos tempos de retenção (t_R), comprometendo a identificação dos analitos, a precisão e a exatidão da análise.

A morfologia dos picos é fruto dos mecanismos de movimentação aleatória das moléculas do analito durante a passagem de sua banda ou fração através da coluna. A combinação aditiva dos movimentos aleatórios de migração das várias moléculas do analito se reflete no detector após a eluição da banda (SKOOG et al., 2008). Quanto mais harmônicos os processos de transferência das moléculas de um analito entre as fases móvel e estacionária, mais homogêneas serão suas velocidades de migração na coluna, possibilitando

bandas (*frações*) bem definidas e gerando picos cromatográficos bem resolvidos e simétricos no detector.

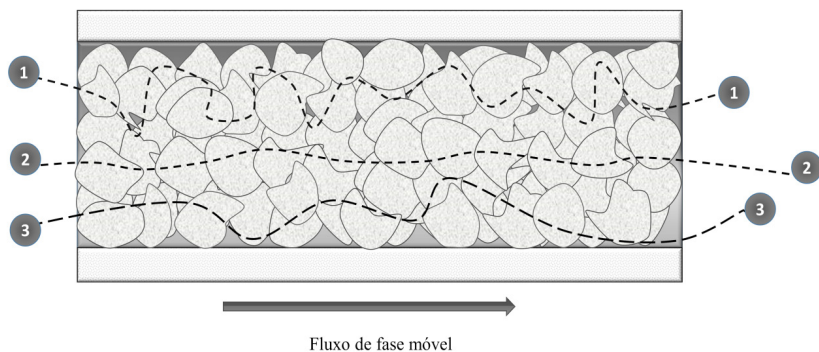
Numa coluna que opera sob condições eficientes, existe pouca variabilidade das velocidades de migração das moléculas do analito na zona da coluna em que elas se encontram, havendo baixa dispersão (espalhamento) da banda. Algumas variáveis e parâmetros influenciam diretamente na eficiência da coluna, de maneira que o cromatografista, conhecendo o efeito de cada um desses fatores, pode controlá-los, a fim de configurar o seu método cromatográfico para obter melhor eficiência da coluna.

Há três fenômenos fundamentais em cromatografia que afetam drasticamente a eficiência da coluna: (1) efeitos de múltiplos caminhos (*eddy diffusion*); (2) difusão molecular longitudinal; e (3) processos de transferência de massa entre as fases (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG et al., 2008; HARRIS, 2010). A seguir, entenderemos esses fenômenos do ponto de vista físico e como eles podem afetar a eficiência da coluna e, conseqüentemente, os resultados analíticos.

Efeito dos múltiplos caminhos (Difusão turbulenta)

Esse fenômeno caracteriza-se pela difusão das moléculas do analito através de caminhos preferenciais aleatórios no interior de colunas empacotadas, não ocorrendo, portanto, em cromatografia gasosa capilar. Numa coluna empacotada, na qual a fase estacionária preenche o interior do tubo, podem existir vários caminhos entre as partículas de fase estacionária devido ao arranjo randômico e/ou à morfologia irregular das partículas do suporte sólido, resultando em imperfeições no empacotamento (JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997). Esses caminhos possibilitam trajetórias variáveis e aleatórias para as moléculas do analito durante o processo de eluição (Figura 4.10), ocasionando variabilidades nos tempos de residência das moléculas na coluna e conseqüente alargamento de banda (SKOOG et al., 2008; LANÇAS, 2009; HARRIS, 2010).

Figura 4.10 - Efeito de múltiplos caminhos em cromatografia, considerando as trajetórias preferenciais de três moléculas de um mesmo analito em uma coluna empacotada



Fonte: Elaborada pelos autores.

Observamos na Figura 4.10 que, devido ao efeito dos múltiplos caminhos, as moléculas chegam em tempos diferentes ao final da coluna. A molécula 1, por ter sofrido uma trajetória mais irregular (*tortuosa*) do que as moléculas 2 e 3, chega por último ao final da coluna. Já a molécula 2, com trajetória mais linear, atinge o final da coluna de forma mais rápida do que as demais moléculas. Como afirmado anteriormente, quanto maior a disparidade de velocidades das moléculas de um mesmo analito, mais intenso o alargamento de banda cromatográfica.

Com o advento das colunas capilares com tubo aberto, a influência desse efeito foi eliminada na cromatografia gasosa capilar, tendo em vista que, nesse tipo de coluna, a fase estacionária não preenche o interior do tubo.

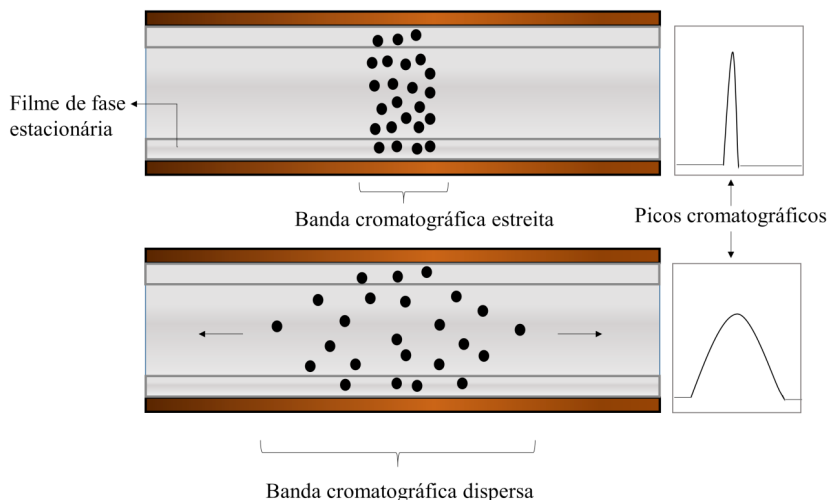
Difusão molecular longitudinal

É um fenômeno resultante da dispersão das moléculas do analito contidas na fase móvel, a partir das regiões centrais da banda (zona) cromatográfica (*regiões mais concentradas*), em direção às regiões menos concentradas. A difusão molecular longitudinal ocorre devido ao gradiente de concentração do analito

existente entre as regiões centrais da banda cromatográfica e as suas regiões limítrofes, tanto na direção do fluxo de fase móvel, como na direção contra o fluxo (Figura 4.11) (MCNAIR; MILLER, 1997; BARRY; GROB, 2007).

Em cromatografia gasosa, esse fenômeno é tradicionalmente um dos principais responsáveis pelos processos de alargamento de banda, tendo em vista que as moléculas possuem coeficientes de difusão mais elevados em fase gasosa (SKOOG et al., 2008).

Figura 4.11 - Processo de difusão molecular longitudinal em coluna capilar e morfologia dos picos relativos às bandas cromatográficas



Fonte: Elaborada pelos autores.

Na Figura 4.11, ilustra-se a difusão longitudinal no interior da coluna, com as moléculas do analito concentradas numa estreita região da coluna, caracterizando a banda cromatográfica bem definida, seguida da dispersão das moléculas ao longo do eixo do fluxo de fase móvel. É mostrado também o perfil hipotético da morfologia dos picos cromatográficos resultantes das respectivas bandas.

É importante salientar que os processos de alargamento de banda acontecem no sistema injetor, na coluna e no detector, em virtude da dispersão da banda do vapor da amostra. Entretanto, os efeitos de alargamento mais drásticos ocorrem na coluna (WATERS, 2017). As condições cromatográficas do método analítico podem ser configuradas para que o fenômeno de difusão longitudinal seja minimizado, obtendo-se maior eficiência de coluna.

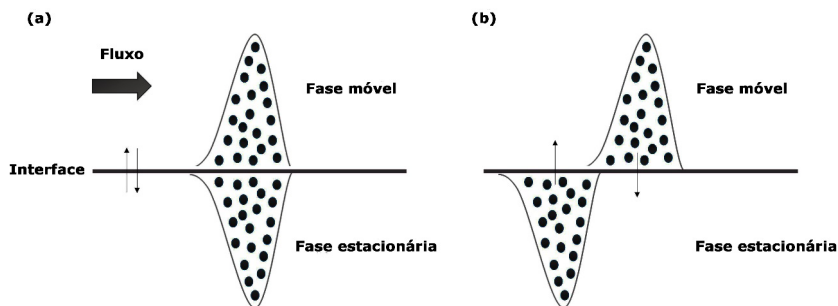
Processos de transferência de massa

Para que a separação cromatográfica seja eficiente, os processos de transferência de massa (*transferência das moléculas dos analitos*) entre as fases móvel e estacionária devem ser “equilibrados”, de maneira que não haja disparidades de resistência à transferência de uma fase para outra entre as moléculas do analito. Objetivamente, é desejável que as moléculas se distribuam com velocidades homogêneas entre as duas fases, havendo baixa resistência à transferência das partículas da fase móvel para a fase estacionária e da fase estacionária para a fase móvel (MCNAIR; MILLER, 1997; JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997).

Quando os processos de transferência de massa ocorrem homogeneamente entre as fases, como também com velocidades adequadas, o fracionamento das bandas dos compostos da amostra ocorre em maior extensão, havendo melhor separação dos picos cromatográficos. Na Figura 4.12, podemos observar esquema ilustrativo que mostra um processo de transferência de massa adequado em (a) e um processo de transferência não homogêneo em (b).

A seguir, avaliaremos quais os principais fatores que afetam a eficiência da coluna em CG, e como cada fator atua na potencialização ou mitigação dos processos de alargamento de banda cromatográfica.

Figura 4.12 - Representação da alteração dos processos de transferência de massa entre as fases da coluna cromatográfica. (a) Processo de transferência de massa equilibrado e homogêneo; (b) Desequilíbrio dos processos de transferência



Fonte: Elaborada pelos autores.

Fatores relacionados à eficiência da coluna

Entre as variáveis mais relevantes para a eficiência de coluna, podemos citar (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG et al., 2008):

- velocidade média de migração linear da fase móvel (μ);
- coeficiente de difusão do analito na fase móvel (D_M);
- coeficiente de difusão do analito na fase estacionária (D_E);
- fator de retenção (k);
- raio da coluna capilar (r_c) / diâmetro interno da coluna (d_c);
- espessura do filme da fase estacionária (d_f).

Conhecendo os efeitos de cada uma dessas variáveis, o cromatografista é capaz de projetar e desenvolver um método analítico no qual sua coluna opere sob condições de máxima eficiência para a aplicação pretendida.

Efeito da velocidade linear média da fase móvel (μ)

A velocidade linear da fase móvel possui grande influência sobre os processos de transferência de massa entre as fases. A resistência à transferência de massa tende a reduzir em proporção direta com a redução da velocidade linear da fase móvel (μ). Uma vez que

as moléculas do analito distribuem-se no seio de uma das fases do sistema, a transferência dessas moléculas para a outra fase dependerá da difusão das mesmas até a interface fase móvel/fase estacionária. Com velocidades lineares da fase móvel mais baixas, o tempo que as moléculas do analito levam para difundir até a interface entre as fases é relativamente mais curto do que o tempo que a fase móvel leva para deslocar-se na região onde ocorrem os processos de transferência. Como resultado, os processos de transferência ocorrem satisfatoriamente, havendo menor tendência a alargamento de banda (JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997).

Resumidamente, quanto maior o tempo de contato de um determinado elemento de volume da fase móvel (gás de arraste) com um determinado elemento de volume da fase estacionária, mais eficientes os processos de transferência de massa (SKOOG et al., 2008). Porém, há um limite para a redução de μ , não significando que reduzir a velocidade linear indefinidamente promoverá o aumento de eficiência da coluna e nem da análise, uma vez que também se deve atentar para o tempo de corrida cromatográfica, que deve ser o menor possível. Isso será discutido com mais detalhes quando avaliarmos a equação de Van Deemter e a equação de Golay.

Coefficientes de difusão do analito (D_M e D_E)

O coeficiente de difusão (D) de uma espécie química, em um determinado meio ou ambiente químico, é um parâmetro relacionado com a mobilidade dessa espécie nesse meio, sendo constante para essa espécie e igual à velocidade de migração sob gradiente de concentração unitário. Tal parâmetro é tradicionalmente expresso na unidade m^2/s (SKOOG et al., 2008; IUPAC, 2012).

Em cromatografia, seja ela líquida ou gasosa, considerando que as moléculas dos analitos distribuem-se entre duas fases (móvel e estacionária), ou seja, dois meios diferentes, dois coeficientes de difusão relacionados ao analito são importantes: coeficiente de difusão na fase móvel (D_M) e o coeficiente de difusão na fase estacionária

(D_E) (MCNAIR; MILLER, 1997; JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997).

A relevância desses coeficientes para a eficiência da coluna reside no fato de que eles estão intimamente relacionados com o tempo que as moléculas do analito permanecem distribuídas em cada fase do sistema, durante uma etapa de transferência. Objetivamente, os coeficientes de difusão relacionam-se, portanto, com a resistência à transferência de massa. Caso um determinado analito possua o coeficiente de difusão na fase estacionária com um valor significativamente mais reduzido do que o seu coeficiente de difusão na fase móvel, as moléculas desse analito tenderão a permanecer muito mais tempo distribuídas na fase estacionária, provocando desequilíbrio nos processos de transferência de massa e redução da eficiência da coluna.

Raio e diâmetro interno da coluna cromatográfica (r_c)

O raio da coluna (r_c) e, conseqüentemente, o seu diâmetro interno (d_c) são parâmetros dimensionais relacionados à eficiência da coluna, pois também atuam nos processos de transferência de massa. De uma maneira geral, avaliando isoladamente o efeito do diâmetro interno, colunas com diâmetros internos mais reduzidos proporcionam processos de transferência de massa mais eficientes, mitigando o alargamento de banda. Em colunas com menores diâmetros, as distâncias que as moléculas distribuídas na fase móvel precisam percorrer, até atingir a interface com a fase estacionária, são relativamente menores, favorecendo a transferência entre as fases (MCNAIR; MILLER, 1997).

Em colunas com diâmetros menores, o efeito de difusão longitudinal tende a ser menos intenso, uma vez que a coluna possuirá um menor volume interno, reduzindo a probabilidade de dispersão da banda cromatográfica.

Espessura do filme da fase estacionária (d_f)

O efeito da espessura do filme da fase estacionária (d_f) sobre a eficiência da coluna é análogo ao efeito do diâmetro da coluna (d_c), de maneira que, em colunas com maiores espessuras de filme, a permanência das moléculas na fase estacionária é potencializada. Nessa situação, avaliando-se isoladamente o efeito da espessura do filme, os processos de transferência são governados pela fase estacionária. Em colunas com espessuras do filme reduzidas, ocorre o efeito oposto, com os processos de transferência de massa sendo governados pela fase móvel (MCNAIR; MILLER, 1997).

É importante salientar que os efeitos da espessura do filme e do diâmetro da coluna devem ser avaliados conjuntamente, assim como os demais fatores explorados até aqui.

A equação de Golay

A expressão matemática fundamental que descreve a eficiência de colunas cromatográficas é a equação de Van Deemter (Equação 4.1), a qual pode ser expressa em sua forma simplificada como (BARRY; GROB, 2007):

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Em que:

H = altura equivalente a um prato teórico;

A = termo associado ao fenômeno de difusão turbulenta (*efeito dos múltiplos caminhos*);

B = termo relacionado à difusão molecular longitudinal;

C = termo relativo à resistência à transferência de massa entre as fases, que incorpora os termos de transferência de massa na fase móvel (C_M) e na fase estacionária (C_E);

μ = velocidade média linear da fase móvel.

Observamos que a equação de Van Deemter é um modelo matemático que descreve a eficiência da coluna, na forma de altura de prato teórico (H), em função da velocidade linear da fase móvel (μ) e dos demais fenômenos que podem afetar a eficiência: efeito dos múltiplos caminhos (A), difusão molecular longitudinal (B) e processos de transferência de massa (C).

No caso de colunas cromatográficas capilares, como sabemos, os efeitos de múltiplos caminhos não ocorrem, de maneira que o termo A pode ser desconsiderado na avaliação da eficiência de colunas desse tipo. Assim, a equação de Van Deemter pode ser escrita na forma abaixo (Equação 4.2), sendo denominada equação de Golay, em referência a Marcel Golay, desenvolvedor das colunas capilares no ano de 1957 (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG et al., 2008; BARRY; GROB, 2007).

$$H = \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Considerando os termos de resistência à transferência de massa para a fase móvel (gás de arraste), C_M , e para a fase estacionária, C_E , podemos escrever a equação de Golay na forma:

$$H = \frac{B}{\mu} + (C_M + C_E)\mu \quad (\text{Eq. 4.3})$$

O termo de difusão longitudinal (B)

O termo B pode ser definido matematicamente em função do coeficiente de difusão do analito na fase móvel (gás de arraste), em colunas capilares, como se segue (Equação 4.4):

$$B = 2 * D_g \quad (\text{Eq. 4.4})$$

A Equação 4.4 reflete claramente que a extensão de ocorrência de difusão longitudinal durante a análise cromatográfica é consequência direta do tempo de residência das moléculas do analito na fase móvel e da natureza do gás de arraste, uma vez que o analito possuirá diferentes coeficiente de difusão para cada tipo de gás de arraste. O efeito da difusão longitudinal é mais relevante em condições de velocidade linear de fase móvel mais baixa e menos importante em velocidades lineares relativamente mais altas (BARRY; GROB, 2004).

Isso fica claro quando observamos que, na equação de Golay, o termo geral relativo ao fenômeno da difusão longitudinal é expresso como (B/μ) , de maneira que para maiores valores de μ , menor será a contribuição deste termo para a elevação de H (alargamento de banda cromatográfica). Essa relação entre B e μ é explicada pelo fato de que, em maiores velocidades lineares da fase móvel (maiores vazões), o tempo de residência das moléculas do analito na coluna é relativamente menor, reduzindo-se o tempo disponível para ocorrência da difusão molecular (MCNAIR; MILLER, 1997). Contudo, veremos mais adiante que a velocidade linear da fase móvel não pode ser elevada indefinidamente.

Do ponto de vista prático, um valor de D_g relativamente mais baixo é também desejável para que o fenômeno de difusão longitudinal seja menos pronunciado, com o termo B não contribuindo para a elevação de H , possibilitando uma condição mais favorável para a eficiência da coluna. De uma maneira geral, é possível proporcionar coeficientes de difusão mais reduzidos selecionando gases de arraste com pesos moleculares mais elevados, como N_2 e Ar (argônio) (MCNAIR; MILLER, 1997). Porém, outras questões devem ser consideradas no que tange à seleção do gás de arraste.

O termo de transferência de massa (C)

Esse termo está associado, como sabemos, a dois fenômenos: resistência à transferência de massa na fase móvel e resistência à

transferência de massa na fase estacionária. Desse modo, o termo C é resultante da associação entre C_M e C_E , conforme Equação 4.5.

$$C = C_M + C_E \quad (\text{Eq. 4.5})$$

O termo C é considerado o fator de maior contribuição para os processos de alargamento de banda. O termo C_M é, por sua vez, expresso pela Equação 4.6:

$$C_M = \frac{(1 + 6k + 11k^2) * r_c^2}{24(1 + k)^2 * D_g} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Como vemos, existe uma relação de proporcionalidade entre C_M e o quadrado do raio da coluna r_c , significando que a resistência à transferência de massa na fase móvel tende a elevar-se com o aumento do diâmetro da coluna. Observamos também que há uma relação inversamente proporcional entre C_M e o coeficiente de difusão do analito na fase móvel, ou seja, para maiores valores de D_g para o analito, menor será C_M , havendo, portanto, menor resistência à transferência de massa na fase móvel e uma maior eficiência da coluna. A transferência de massa, em ambas as fases, como mostra a Equação 4.6, também é dependente do fator de retenção do analito k (MCNAIR; MILLER, 1997; BARRY; GROB, 2004).

Nesse sentido, agora temos uma aparente contradição: anteriormente, afirmamos que valores relativamente mais elevados de D_g proporcionam alargamento de banda devido aos processos de difusão molecular. Isso continua sendo verdade. Porém, é preciso ter em mente que se faz necessário um compromisso entre todos os fatores que afetam a eficiência da coluna, de modo que esse compromisso está atrelado às características dos analitos a serem sepa-

rados. Ou seja, é necessário que, durante a concepção do método cromatográfico, estude-se a condição cromatográfica na qual o coeficiente de difusão D_g do analito no gás de arraste contribua o menos possível para a difusão molecular longitudinal (valores reduzidos de B/μ), sem afetar de maneira drástica os processos de transferência de massa na fase móvel (valores reduzidos de C_M).

O termo C_E é expresso pela equação abaixo (Equação 4.7):

$$C_E = \frac{2kd_f^2}{3(1+k)^2 * D_E} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Nessa equação, observamos a dependência de C_E à espessura do filme da fase estacionária d_f e ao coeficiente de difusão do analito na fase estacionária D_E . Observe-se que, de forma geral, a resistência à transferência de massa na fase estacionária pode ser minimizada pelo uso de colunas com espessuras do filme mais reduzidas. A dependência de C_E ao coeficiente de difusão na fase estacionária D_E , apresentando relação inversamente proporcional, mostra que, para valores relativamente maiores de D_E , teremos menor resistência à transferência de massa na fase estacionária, visto que haverá uma redução de C_E e, conseqüentemente, redução de H (MCNAIR; MILLER, 1997; JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997; BARRY; GROB, 2004).

Analogamente aos processos de transferência de massa na fase móvel, em condições em que haja maior mobilidade das moléculas dos analitos na fase estacionária (maiores valores de D_E) e menores espessuras do filme da fase estacionária, mais facilitada será a transferência das moléculas do analito para a fase móvel. Diferentemente do coeficiente de difusão na fase móvel, o coeficiente de difusão na fase estacionária não pode ser usualmente controlado, exceto pela seleção de colunas com fases estacionárias com viscosidade mais baixa. Em colunas capilares com filmes finos (0,25 μ m, por exemplo), a resistência à transferência de massa na fase estacionária é

mínima, sendo os processos de transferência de massa governados pelo termo C_M (MCNAIR; MILLER, 1997).

Outro aspecto importante da Equação 4.8 é a razão abaixo:

$$\frac{k}{(1+k)^2} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Valores elevados de k , para um dado analito, denotam elevada solubilidade desse analito na fase estacionária. A razão acima pode ser minimizada para maiores valores de k , minimizando-se o termo C_E . No entanto, para valores k acima de 20, reduções mínimas da razão $k/(1+k)^2$ são obtidas, havendo, em contrapartida, aumento desnecessário do tempo de análise (MCNAIR; MILLER, 1997).

Da abordagem matemática explorada acima, podemos reescrever a equação de Golay na seguinte forma:

$$H = \frac{2 * D_g}{\mu} + \frac{(1 + 6k + 11k^2) * r_c^2}{24(1 + k)^2 * D_g} * \mu + \frac{2kd_f^2}{3(1 + k)^2 * D_E} * \mu \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Em que:

H = altura equivalente a um prato teórico (cm);

μ = velocidade linear da fase móvel (cm/s);

D_g = coeficiente de difusão do analito na fase móvel (cm²/s);

K = fator de retenção;

r_c = raio da coluna capilar (cm);

d_f = espessura do filme da fase estacionária;

D_E = coeficiente de difusão do analito na fase estacionária.

Observe que a equação acima mostra a dependência da altura do prato teórico H (eficiência de coluna) com relação a todos os fatores que afetam o alargamento de banda em colunas capilares.

Otimização da velocidade linear da fase móvel e a eficiência da coluna

Como vimos, a velocidade linear média da fase móvel (μ) possui significativa influência sobre a eficiência da separação de uma coluna cromatográfica (H). Existe uma velocidade linear ótima ($\mu_{ótima}$), na qual uma coluna cromatográfica possuirá uma altura de prato teórico mínima (H_{min}) para a separação de um determinado analito, ou seja, uma velocidade linear média na qual a coluna irá operar sob máxima eficiência. A velocidade linear ótima pode ser determinada experimentalmente por meio da obtenção de um gráfico de H versus μ , cujo traçado é denominado tradicionalmente de Curva de Van Deemter (MCNAIR; MILLER, 1997; JENNINGS; MITTFELDELT; STREMPLE, 1997; HARRIS, 2010).

Para construir um gráfico $H \times \mu$, é necessário que se escolha um composto de referência e se conduzam várias corridas cromatográficas de uma solução padrão deste composto, em diferentes velocidades lineares (diferentes vazões de gás de arraste), sob condição isotérmica de temperatura da coluna (MCNAIR; MILLER, 1997). A quantidade de valores de μ a serem testados deve ser o maior possível. Deve-se verificar, no manual do fabricante do cromatógrafo, qual o valor mínimo e o máximo de vazão da fase móvel em que o equipamento é capaz de operar e estabelecer os valores de μ dentro dessa faixa.

Deve-se lembrar da relação entre velocidade linear média de fase móvel e vazão da fase móvel (F) para uma coluna capilar, para converter os valores de vazão em velocidade linear (SKOOG et al., 2008):

$$F = \pi * r_c^2 * \mu \quad (\text{Eq. 4.10})$$

Após as corridas cromatográficas conduzidas nas diferentes velocidades lineares da fase móvel (diferentes vazões), devem ser calculados os valores de H relativos aos picos cromatográficos obtidos para o composto teste, para cada valor de μ avaliado. O cálculo dos valores de H pode ser feito por via indireta, utilizando os valores do número de pratos teóricos (N) da coluna (Equação 4.10), relativos aos picos cromatográficos, obtidos para o composto teste em cada uma das diferentes corridas cromatográficas (MCNAIR; MILLER, 1997).

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Em que:

N = número de pratos teóricos;

t_R = tempo de retenção (min);

W_b = largura de base do pico cromatográfico (min).

Uma vez calculados os valores de N , os valores de H podem ser estimados pela relação entre N , H e o comprimento da coluna L :

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

Na Tabela 4.6, temos um exemplo de valores obtidos para μ e H em um estudo de estimativa da velocidade linear ótima $\mu_{\text{ótima}}$.

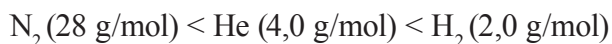
Tabela 4.6 - Valores de velocidade linear da fase móvel e alturas de prato teórico relativas.

| μ (cm/s) | H (mm) |
|--------------|----------|
| 2 | 1,0 |
| 10 | 0,263 |
| 20 | 0,260 |
| 30 | 0,256 |
| 40 | 0,302 |
| 50 | 0,355 |
| 60 | 0,412 |
| 70 | 0,470 |
| 80 | 0,529 |
| 90 | 0,590 |
| 100 | 0,650 |

Fonte: Harris (2010).

Os gráficos $H \times \mu$ possuem um perfil geral de hipérbole assimétrica, como mostra a Figura 4.13, com a velocidade linear ótima no ponto de mínimo da curva, sendo associada, portanto, à altura do prato teórico mínima, caracterizando a condição de eficiência mais alta. É importante que se tenha em mente que a velocidade linear ótima da fase móvel varia segundo a natureza do gás de arraste, posto que o coeficiente de difusão de um dado composto varia conforme a massa molar do gás (MCNAIR; MILLER, 1997; HARRIS, 2010).

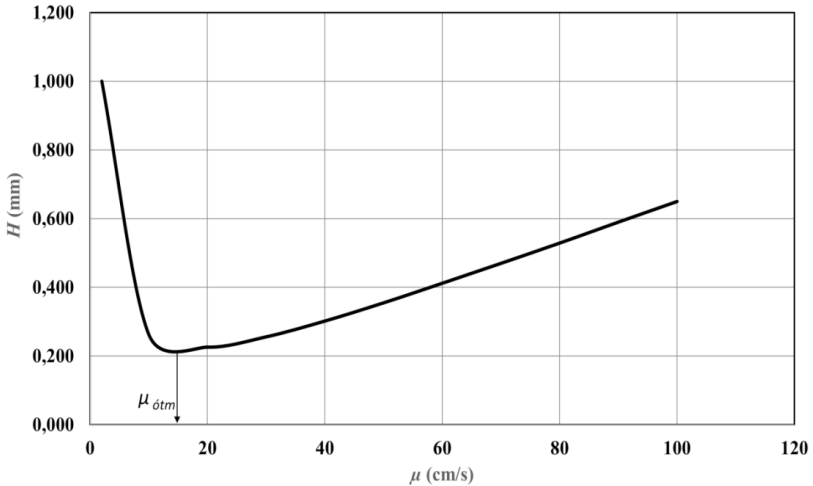
Como já discutido aqui, um mesmo composto possuirá maior difusibilidade em gases com menores pesos moleculares. Considerando os três gases mais empregados nas aplicações de CG, nitrogênio (N_2), hélio (He) e hidrogênio (H_2), o coeficiente de difusão do analito aumentará segundo a ordem (HARRIS, 2010):



É preciso salientar que a otimização em cromatografia está associada tanto à eficiência da separação da coluna (H mínimo), como ao tempo de análise, visto que, dependendo do tipo de gás de arraste, o H mínimo

para a coluna é obtido em velocidades lineares da fase móvel mais baixas, elevando o tempo de análise. Nesse caso, ao se empregar nitrogênio (N_2) como gás de arraste, a obtenção de H mínimo ocorre em velocidades lineares mais baixas do que com os outros gases citados, proporcionando, então, análises mais lentas, sob condições ótimas de eficiência da coluna. Isso é explicado também pela questão da difusibilidade, que é menor em gases com maior massa molar (MCNAIR; MILLER, 1997; HARRIS, 2010).

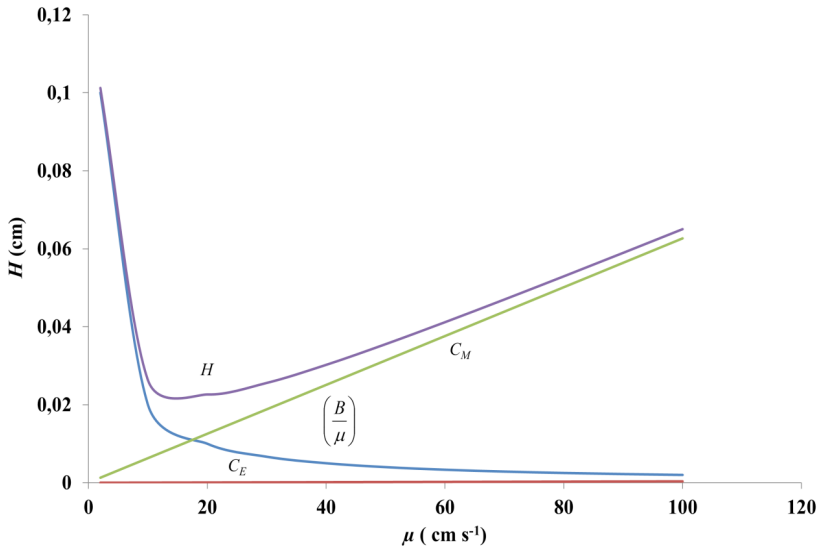
Figura 4.13 - Gráfico da altura do prato teórico (H) em função da velocidade linear da fase móvel (μ) de um estudo de otimização da vazão



Fonte: Elaborada pelos autores.

Observando o gráfico acima, vemos que, para esse estudo de otimização, a velocidade linear da fase móvel ótima é aproximadamente 14,5cm/s. Se considerarmos uma coluna capilar com diâmetro interno de 0,25mm ($r_c = 0,125$ mm), teremos, portanto, a vazão ótima em torno de 0,42ml/min. Na Figura 4.14, temos a representação do efeito da velocidade linear da fase móvel sobre os diferentes termos da equação de Golay, considerando uma coluna capilar com baixa espessura do filme da fase estacionária (0,25 μ m).

Figura 4.14 - Efeito da velocidade linear da fase móvel sobre a difusão longitudinal e a transferência de massa na fase móvel e fase estacionária



Fonte: Elaborada pelos autores.

O gráfico acima reflete, de maneira clara, a influência de μ sobre os fenômenos que afetam o alargamento de banda, sendo uma síntese do que já abordamos até aqui. Observe que o aumento de μ promove redução do efeito de difusão molecular longitudinal (termo B/μ), mas, por outro lado, causa uma elevação da resistência à transferência de massa na fase móvel.

Veja que o ponto de interseção entre as linhas do gráfico que representam o efeito da difusão longitudinal (B/μ) e o termo de transferência de massa na fase móvel C_M caracteriza a condição em que esses efeitos sobre o alargamento de banda são mínimos, de forma que esse ponto corresponde também ao H mínimo. Finalmente, fica claro que o efeito dos processos de transferência de massa na fase estacionária C_E não é relevante nessa situação, tendo em vista a baixa espessura do filme da coluna, sendo os processos de transferência de massa governados pela resistência à transferência na fase móvel C_M .

Outras vias de otimização do método cromatográfico em CG

Otimizando a resolução do pico cromatográfico

É possível ao cromatografista estimar qual o número médio de pratos teóricos (N) requeridos para sua coluna, a fim de que possa obter uma determinada resolução de pico R_s entre dois compostos A e B. Na Equação 4.12, abaixo, mostra-se a relação entre a resolução de pico R_s , a seletividade da coluna (α), o número de pratos teóricos (N) e o fator de retenção (k) do composto mais retido, entre os dois compostos envolvidos, sendo o composto B (SKOOG et al., 2008):

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} * \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) * \left(\frac{k_B}{1 + k_B}\right) \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Essa equação pode ser resolvida para N , sendo escrita como (Equação 4.14):

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B}\right)^2 \quad (\text{Eq. 4.14})$$

As equações acima mostram que existem dois caminhos pelos quais podemos manipular o valor da resolução entre dois picos cromatográficos: alterando o valor de α ou alterando o valor do fator de retenção do composto mais retido (k_B).

Para modificar os valores de k , devem ser conduzidas modificações na programação de temperatura da corrida cromatográfica. Para elevar o valor de k , é preciso reduzir a temperatura da coluna, potencializando a retenção dos analitos na fase estacionária. Porém, valores de k_B maiores que 10 não proporcionam ganhos na resolução e elevam os tempos de retenção, aumentando o tempo de análise desnecessariamente. Na prática, valores ideais de k_B situam-se na faixa entre 1 e 5 (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG et al., 2008).

A modificação do valor de α é conduzida por meio da alteração da fase estacionária empregada, o que implica troca da coluna cromatográfica. Portanto, a alteração dos valores de α na otimização de um método cromatográfico é uma medida pouco conveniente, sendo conduzida apenas em situações críticas. Para usufruir dessa alternativa, os laboratórios devem adquirir diversas colunas cromatográficas, demandando mais recursos financeiros.

Otimizando o tempo de análise

Como já mencionado, a otimização de um método cromatográfico envolve a obtenção das melhores separações de pico (melhores resoluções), no menor tempo de análise possível. Infelizmente, esse é um ajuste difícil, posto que a melhoria da resolução envolve aumento do tempo de corrida, havendo a necessidade de um compromisso entre resolução de pico e tempo de análise (SKOOG et al., 2008).

A Equação 4.15 mostra a relação entre resolução R_s e tempo de corrida cromatográfica, com base no tempo de retenção do analito mais retido $t_{R,B}$.

$$t_{R,B} = \frac{16R_s^2 H}{\mu} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right)^2 * \frac{(1+k_B)^3}{k_B^2} \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Com essa equação, é possível estimar o tempo de corrida cromatográfica requerido para a eluição de dois compostos A e B com uma resolução R_s .

Cromatografia bidimensional

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CGxCG) foi idealizada em 1991 por Liu e Phillips (LIU; PHILLIPS, 1991). Nessa modalidade de cromatografia, são utilizadas duas colunas cromatográficas de fases estacionárias diferentes, acopladas em série. Es-

sas colunas são separadas por um modulador. A primeira coluna apresenta dimensões convencionais, e a segunda coluna, necessariamente, deve ser menor do que a primeira, do tipo *fast-GC* (ADAH-CHOUR et al., 2005). O modulador é o principal componente desse tipo de sistema. Ele faz a amostragem da banda cromatográfica eluída da primeira coluna (coluna de primeira dimensão ou 1D), focaliza essa fração, concentrando-a, e a libera para a segunda coluna (coluna de segunda dimensão ou 2D) (GÓRECKI; HARYNUK; PANIĆ, 2004). Então, esta coluna, composta de outra fase estacionária, separa os componentes da fração eluída da primeira coluna. Isso permitiu a obtenção de melhores resultados nas separações cromatográficas, sobretudo em matrizes complexas, como amostras ambientais ou biológicas (SHIMADZU, 2015).

Na Tabela 4.7, podem ser vistas algumas aplicações da CGxCG para organoclorados e agrotóxicos em várias matrizes.

Tabela 4.7 - Aplicações da CGxCG a diferentes compostos organoclorados e agrotóxicos em várias matrizes

| Analitos | Tipo de amostra | Deteção |
|--|--------------------------------------|----------------|
| 8 agrotóxicos (organofosforado, anilida, pirazol, triazol, estrobilurina e piretróide) | Sedimento | μECD |
| Seis compostos da classe dos piretroides | Uva | μECD |
| Agrotóxicos organoclorados (OCPs), bifenilas policloradas (PCBs), éteres difenílicos policlorados (PBDEs), dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), naftalenos policlorados (PCNs), terfenilas policloradas (PCTs) e toxafeno (CTT) | Carne de porco, ovos e leite materno | μECD |
| Cinco enantiômeros do toxafeno | Óleo de peixe | μECD |
| Agrotóxicos organoclorados (OCPs), bifenilas policloradas (PCBs) e polibromadas (PBBs), éteres difenílicos policlorados (PBDEs), dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), naftalenos policlorados (PCNs), terfenils policlorados (PCTs), toxafeno (CTT), naftalenos (PCNs) e dibenzotiofenos (PCDTs) | Sedimento e poeira | μECD |

| Analitos | Tipo de amostra | Deteção |
|---|-------------------------------|----------------|
| Nove fungicidas | Vegetais | μ ECD |
| Toxafeno | Misturas técnicas | μ ECD |
| 31 agrotóxicos organofosforados, piretroides e triazinas | Frutas | μ ECD |
| Éteres difenílicos policlorados, bifenilas policloradas (PCBs) e polibromadas (PBBs) e agrotóxicos organoclorados (OCPs) | Leite e soro humano | IDTOFMS |
| 20 agrotóxicos (organofosforados, organoclorados, carbamatos, dicarboximidas, benzimidazol, sulfito de alquila e piretroides) | Maça e pêssego | TOFMS |
| 36 agrotóxicos (organofosforados, organoclorados, carbamatos, dicarboximidas, piretroides) | Chás de frutas, verde e preto | TOFMS |
| 32 compostos pertencentes à classe dos organoclorados e organofosforados | Fumo | TOFMS |
| 106 agrotóxicos e outros poluentes, como PCBs e HPAs | Cereal | TOFMS |
| 160 agrotóxicos e outros poluentes, como PCBs, HPAs e bisfenol A | Uva e vinho | TOFMS |
| 49 agrotóxicos (herbicidas ácidos, organofosforados, triazinas, feniluréias, organoclorados, benzotiazóis e benzotriazóis) e outros poluentes orgânicos | Água de rio | TOFMS |
| 34 agrotóxicos organoclorados e organofosforados e outros poluentes orgânicos persistentes | Leite e nata | TOFMS |
| Compostos organoclorados, tridecano, benzenos, fenóis, naftalenos aminas e ftalatos | Mistura de padrões | FID |
| 15 agrotóxicos (ácido benzóico, dinitroanilina, cloroaromático, organofosforado, organoclorado, triazina, cloroacetanilida, acilalaninato, alquil ftalato, dicarboximida) | Soro humano | FID |
| 17 agrotóxicos organofosforados e organosulfurados | Mistura de padrões | FPD |

Fonte: Adaptada de Silvia, Zini e Caramão (2011).

FID: Detector de ionização por chama (flame ionization detector). FPD: Detector fotométrico de chama (flame photometric detector). IDTOFMS: Espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo e diluição isotópica (isotope-dilution time-of-flight mass spectrometry).

Referências bibliográficas

- ADAHCHOUR, M. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1067, n. 1-2, p. 245-254, 2005.
- BARRY, E. F.; GROB, R. L. *Columns for gas chromatography: performance and selection*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007. 313 p.
- BARRY, E. F.; GROB, R. L. *Modern practice of chromatography*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. 1036 p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2006.
- GÓRECKI, T.; HARYNUK, J.; PANIĆ, O. The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). *Journal of Separation Science*, v. 27, p. 359, 2004.
- HARRIS, D. C. *Quantitative chemical analysis*. 8. ed. New York: W. H. Freeman & Company, 2010. 891 p.
- JENNINGS, W.; MITTFELDLT, E.; STREMPLE, P. *Analytical gas chromatography*. Londres: Academic Press, 1997. 383 p.
- LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida moderna*. Átomo: São Paulo, 2009.
- LIU, Z. Y.; PHILLIPS, J. B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science*, v. 29, n. 6, p. 227-231, 1991.
- MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography*. 2. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography: techniques in analytical chemistry*. New York : John Wiley & Sons, 1997.

ROOD, D. *The troubleshooting and maintenance guide for gas chromatographers*. 4. ed. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007.

SILVA, J. M. da; ZINI, C. A.; CARAMAO, E. B. Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com microdetector de captura de elétrons para determinação de agrotóxicos em sedimentos. *Química Nova*, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 962-967, 2011.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. Tradução de Marco Grassi. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

ZEEUW, J.; LUONG, J. Developments in stationary phase technology for gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 21, n. 9, p. 594-607, 2002.

Sites:

AGILENT TECHNOLOGIES. 2015a. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/store/images/category/csd_packed_col_cate.png>. Acesso em: 27 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2005b. Disponível em: <http://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5991-5213EN_GC_Catalog_Columns.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2015c. Disponível em: <http://www.crawfordscientific.com/Agilent_J_W_Phase_Equivalency_Table.htm>. Acesso em 27 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2015d. Disponível em: <http://www.crawfordscientific.com/Agilent_J_W_PLOT_column.htm>. Acesso em: 27 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES, 2015e. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t407133.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES, 2015f. Disponível em: <http://www.crawfordscientific.com/Agilent_J_W_Capillary_Columns.htm>. Acesso em: 28 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2011a. Disponível em: <<http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-GC-Column-Installation.html>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2011b. Disponível em: <<http://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/PN%20830-0120.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

CHROMACADEMY. 2013. Disponível em: <<http://www.chromacademy.com/essential-guide/Oct-2013/Understanding-GC-Methods/figure-28.jpg>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

SGE. 2012. Disponível em: <<http://www.sge.com/uploads/9e/1b/9e1b486486dee5f5027d90d4de1358/MN-0484-C.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

SGE. 2015. Disponível em: <<http://www.sge.com/support/training/columns/capillary-column-selection-guide>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

SUPELCO. 2015a. Disponível em: <http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/Agilent-catalogue-2013/5991-1058EN%20GC_Columns.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2015.

SUPELCO, 2015b. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/specialty-carbon-adsorbents-t410081.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2015.

WATERS. 2017. Disponível em: <https://www.waters.com/waters/pt_BR/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?cid=134803614&locale=pt_BR>. Acesso em: 28 maio 2017.

DETECTORES

Aparecida Liberato Milhome

Ari Clecius Alves de Lima

Fátima Itana Chaves Custódio Martins

Jhonyson Arruda Carvalho Guedes

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Vítor Paulo Andrade da Silva

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

Em um sistema cromatográfico gasoso, os detectores têm a função de converter o analito eluído da coluna em sinal eletrônico, o qual é enviado para o sistema de dados. A grandeza do sinal é representada em função do tempo (desde o momento da injeção) e apresentada na forma de um cromatograma. Alguns detectores são capazes de responder a moléculas de diferentes grupos químicos, chamados de *universais*, enquanto outros respondem apenas a analitos de grupos funcionais ou a estruturas específicas e são denominados *seletivos*. Detectores seletivos apresentam maior intensidade do sinal analítico, ou seja, possuem uma maior sensibilidade.

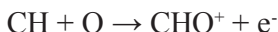
A operação dos detectores requer um ou mais gases, que são usados na combustão, como auxiliares e *make up*. Para obtenção da sensibilidade ótima do detector, é importante observar algumas condições operacionais e as recomendações do fabricante, depen-

dendo do tipo de detector. Por isso, muitas vezes, uma calibração de rotina é necessária.

Atualmente, a cromatografia gasosa possui ampla aplicação, por ocorrer em um equipamento versátil, com custo moderado, de elevada seletividade e sensibilidade que pode ser atingida através de diferentes tipos de detector. A escolha do tipo de detector depende das características do analito e da sensibilidade requerida para a análise. Os principais detectores utilizados são descritos a seguir.

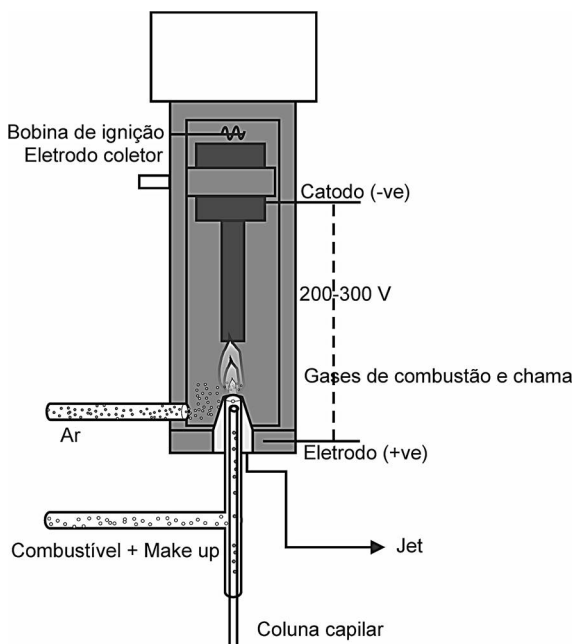
Detector de ionização em chama

O detector de ionização em chama (*flame ionization detector - FID*) consiste em um sistema amplamente usado em cromatografia gasosa. O analito presente no estado gasoso é queimado em uma chama de hidrogênio e oxigênio, produzindo íons e elétrons, conforme equação abaixo. Esses íons são coletados e formam uma corrente, gerando o sinal (MACNAIR; MILLER, 1997; HARRIS, 2012).



O FID é um sistema robusto, de fácil uso, possui alta sensibilidade e é classificado como detector *destrutivo*, pois destrói a molécula do analito, não sendo apropriado para ser usado em série com outros detectores (modo *tandem*). Esquema típico de um sistema FID encontra-se ilustrado na Figura 5.1.

Figura 5.1 - Esquema de um detector de ionização em chama



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

O gás efluente da coluna é misturado com hidrogênio e levado a uma pequena ponta do queimador (jet), o qual se encontra rodeado por um elevado fluxo de ar. A ignição é fornecida pelo equipamento para ativar a chama. Quando um potencial em torno de 200-300V é aplicado entre o jet (anodo) e o eletrodo cilíndrico (catodo), situado acima da chama, os íons formados geram uma corrente que será transferida e amplificada por um circuito de alta impedância. Quando não há presença de analito (compostos contendo carbono) na chama, uma pequena corrente (10^{-14} A) se formará devido a impurezas dos gases. Elevada pureza dos gases (99,995%) é requerida para evitar a formação de ruído de fundo. Filtros para remoção de impurezas de hidrocarbonetos, oxigênio e água presentes nos gases podem ser colocados antes

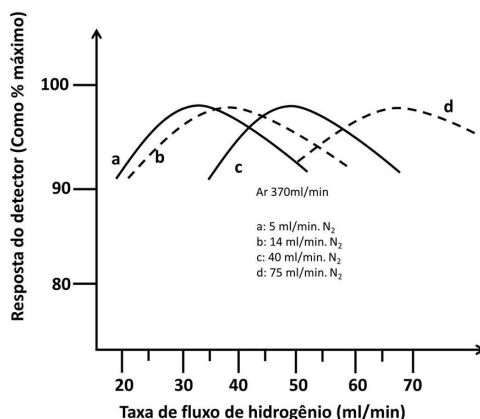
da entrada no sistema cromatográfico. O detector deve ser aquecido a, pelo menos, 125°C para evitar a condensação de água e de amostras de elevado ponto de ebulição. Geralmente, utiliza-se a temperatura do detector 20°C maior que a temperatura mais elevada da rampa cromatográfica, o que envolve temperaturas acima de 250°C.

O fluxo dos gases deve ser otimizado para uma maior eficiência operacional. A razão estequiométrica dos gases usualmente aplicada segue uma proporção de:

1 *make up* : 1 hidrogênio (combustão) : 10 ar sintético.

Gás *make up* (gás auxiliar) tem a função de aumentar o volume de gás efluente da coluna, otimizando a detecção. Essa mistura de gases afeta a sensibilidade do detector e deve ser melhorada antes da análise. A Figura 5.2 mostra que o fluxo de hidrogênio alcança uma sensibilidade máxima para cada fluxo de gás nitrogênio. Para colunas capilares, que possuem fluxo em torno de 1mL/min, gás *make up* é adicionado ao gás de arraste a um fluxo total de 30mL/min. Ar sintético é aplicado em um fluxo, geralmente, de 300-400mL/min (MACNAIR; MILLER, 1997).

Figura 5.2 - Efeito do fluxo de hidrogênio na resposta do FID, em diferentes fluxos de N₂



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

Estudos recentes têm discutido o mecanismo de ionização do analito na chama, porém os processos exatos ainda geram algumas incertezas (SCHOFIELD, 2008). O FID mostra elevada sensibilidade para compostos contendo carbono, sendo a resposta proporcional ao número de átomos de carbono presente no analito (MACNAIR; MILLER, 1997). Quando heteroátomos (tais como N, O, S, P) estão presentes na molécula, a sensibilidade do detector é bastante reduzida. Água não é detectada no FID. Na Tabela 5.1, estão as principais características de um FID:

Tabela 5.1 - Características do detector de ionização em chama

| Detector de ionização em chama | |
|---------------------------------------|--|
| Alta Resposta | Compostos com ligações C-H |
| Baixa ou nenhuma resposta | He, CS ₂ , NH ₃ , Ar, COS, CO, Kr, H ₂ S, CO ₂ , Ne, SO ₂ , H ₂ O, Xe, NO, SiCl ₄ , O ₂ , N ₂ O, SiHCl ₃ , N ₂ , NO ₂ , SiF ₄ |
| Sensibilidade | 100pg |
| Gases | Combustão - hidrogênio e ar sintético; Arraste e <i>make up</i> - nitrogênio ou hélio |
| Temperatura do detector (FID) | 250-30°C |

Fonte: Elaborada pelos autores.

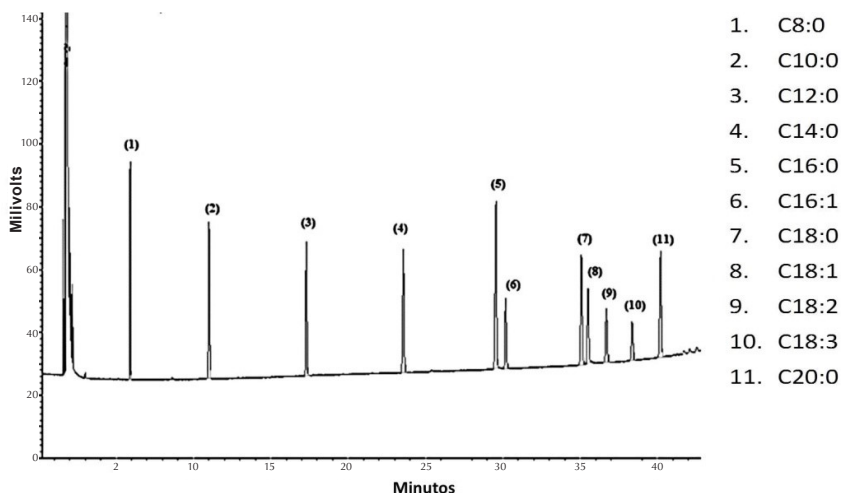
Métodos usando GC-FID são bastante aplicados atualmente, devido à sua capacidade de detectar diferentes compostos orgânicos. Alguns exemplos de análises geralmente realizadas por FID são: análise de voláteis em bebidas alcoólicas (PEREIRA, 2012), hidrocarbonetos em efluentes de petróleo, ácidos graxos em alimentos, biodiesel, entre outros. Na determinação de ácidos graxos, uma reação de esterificação é realizada para conversão dos ácidos graxos em éster-metílicos, a fim de aumentar sua volatilidade. As Figuras 5.3 e 5.4 ilustram cromatogramas de análises de padrão de ácidos graxos (C-8 a C-24) e voláteis em aguardente.

ÁCIDOS GRAXOS

Condições:

- Coluna: OV-5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm
- Gás arraste: nitrogênio (1mL/min)
- Programa de temperatura: 150°C por 1min, 180°C por 1min
- Injetor: *split* (1:50), 250°C
- Detector: FID, 280°C
- *Make up*: nitrogênio 30mL/min

Figura 5.3 - Cromatograma de um padrão de ácido graxo (C-8 a C-24) analisado por GC-FID



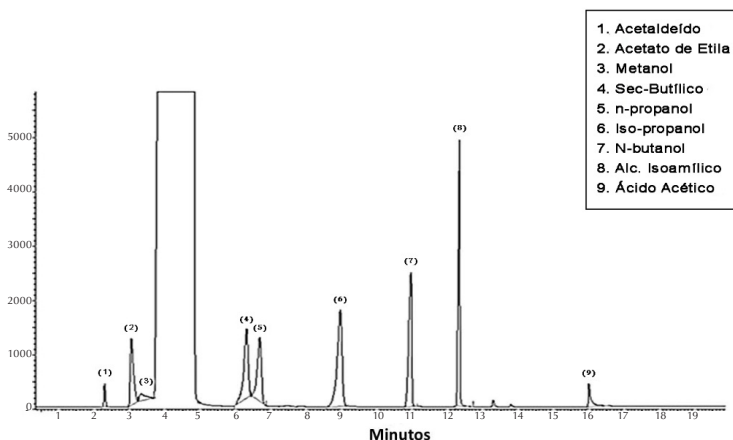
Fonte: Elaborada pelos autores.

COMPOSTOS VOLÁTEIS

Condições:

- Coluna: OV-5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm
- Gás arraste: nitrogênio (1mL/min)
- Programa de temperatura: 150°C por 1min, 180°C por 1min
- Injetor: *split* (1:50), 250°C
- Detector: FID, 280°C
- *Make up*: nitrogênio 60mL/min

Figura 5.4 - Cromatograma de um padrão de voláteis constituintes de aguardente analisados por FID

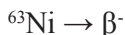


Fonte: Elaborada pelos autores.

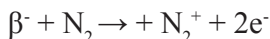
Detector de captura de elétrons

O funcionamento do detector de captura de elétrons (*electron capture detector - ECD*) baseia-se no fenômeno em que espécies eletronegativas podem reagir com elétrons presentes para formar íons carregados negativamente. A perda de tais elétrons está relacionada com a quantidade de analito na amostra. O ECD é seletivo para compostos eletronegativos, tais como clorados, fluorados ou bromados.

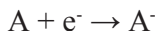
No interior do detector, existe uma fonte radioativa de níquel (^{63}Ni) que emite elétrons (partículas beta). Essa fonte encontra-se selada no detector, para evitar a perda para o ambiente. Só deve ser feita qualquer manutenção por técnico autorizado pelo fabricante do sistema cromatográfico. O radioisótopo (^{63}Ni) só é liberado do sistema em temperaturas acima de 450°C , porém o detector só opera em temperatura máxima de 400°C , sendo protegido contra superaquecimento.



Os elétrons primários (partículas beta) produzidos pela fonte radioativa (${}^{63}\text{Ni}$) colidem com as moléculas de gás (comumente nitrogênio) e dão início ao processo de ionização, com a formação de elétrons secundários e íons positivos:



Essa reação promove a formação de uma nuvem estável de elétrons na célula do detector. A diferença de potencial aplicada (20-100V) entre os eletrodos gera uma corrente elétrica, que é coletada, convertida em um sistema de dados e medida. Uma taxa de pulsos é aplicada de tempos em tempos para manter a corrente constante. Quando os compostos eletronegativos são eluídos da coluna, combinam-se imediatamente com alguns elétrons livres, reduzindo temporariamente a corrente.

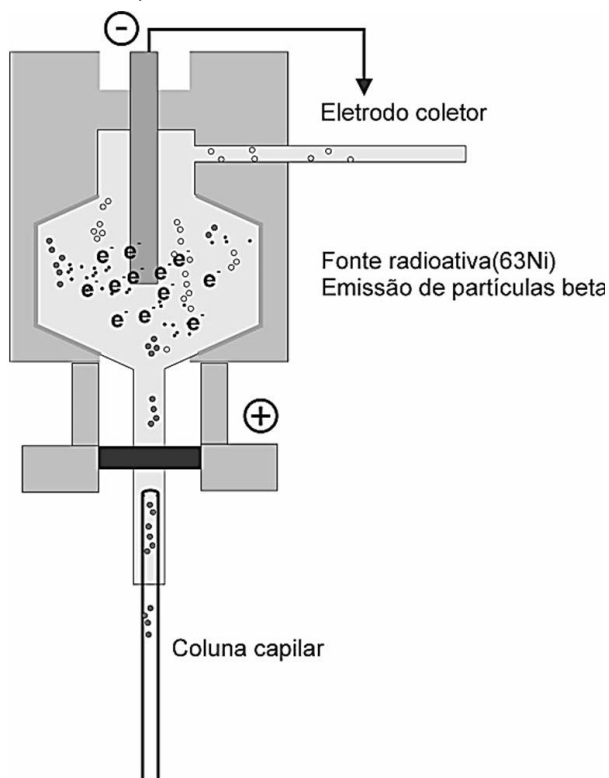


Dessa forma, a população de elétrons é reduzida, e a taxa de pulso é aumentada para manter uma corrente constante e igual ao estado inicial. A taxa de impulsos é convertida para uma saída analógica, que é adquirida pelo sistema de dados. Ao contrário de outros detectores que medem um aumento do sinal, os detectores ECD medem a taxa de pulso necessária para manter a posição corrente.

A operação do ECD requer gases como o nitrogênio ou argônio. Os gases devem ser de elevada pureza (99,999%) e não devem conter mais que 1-2 ppm oxigênio e vapor de água, para evitar a diminuição da produção de elétrons no detector.

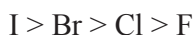
Um esquema da estrutura de um detector de captura de elétrons pode ser observado na Figura 5.5.

Figura 5.5 - Detetor de captura de elétrons



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

A sensibilidade e seletividade do ECD dependem da eletro-negatividade do analito e podem ser afetadas por parâmetros operacionais e condições analíticas. No caso dos halogênios, a resposta do detector diminui na seguinte ordem:



O ECD é um tipo de detector não destrutivo e pode ser usado em série com outro detector, por exemplo, NPD (ŁOZOWICKA, 2013). Na Tabela 5.2, estão as principais características de um ECD.

Tabela 5.2 - Características do detector de captura de elétrons

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| Alta resposta | Compostos halogenados, nitrogenados |
| Sensibilidade | 50fg |
| Gases | Nitrogênio |
| Temperatura | 300-400°C |

Fonte: Elaborada pelos autores.

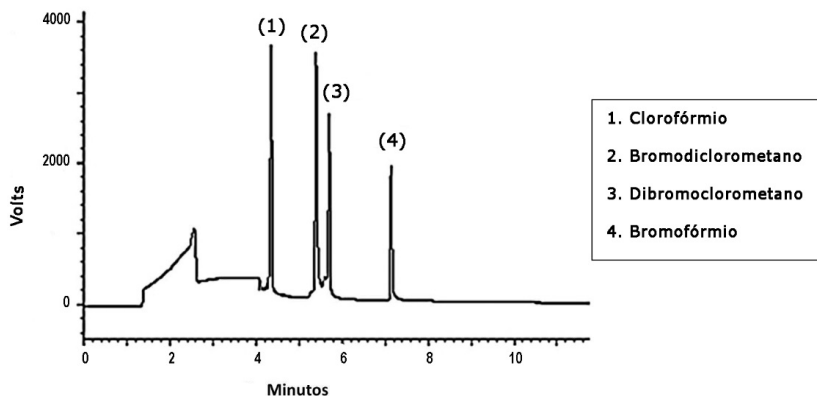
Para a investigação de resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em amostras de água ou alimentos, sistemas tandem ECD-NPD podem ter grande utilidade, devido à sua alta sensibilidade e seletividade a esses componentes.

Diversos métodos de investigação de pesticidas em matrizes ambientais e alimentícias têm sido desenvolvidos utilizando ECD (FURLANI et al., 2011; CONCHA-GRAÑA et al., 2009). O uso de extração por *headspace* associado a ECD tem sido o preferido de diversos laboratórios para análise de orgânicos voláteis (JENNINGS; MITTLEFEHLDT; STREMPLE, 1997).

O ECD tem sido aplicado em análise de produtos de desinfecção do tratamento de água (NIKOLAOU et al., 2002). Compostos como trihalometanos e ácidos haloacéticos apresentam elevada resposta ao ECD. A Figura 5.6 mostra o exemplo de um cromatograma de uma análise de trihalometanos em amostras aquosas, utilizando ECD, sob as seguintes condições cromatográficas:

Condições:

- Coluna: OV-5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm
- Gás arraste: nitrogênio (1mL/min)
- Programa de temperatura: 40°C por 1min, 5°C/min até 70°C e 20°C/min até 250°C (1min)
- Injetor: *splitless* (1min), 200°C
- Detector: ECD 310°C (Base ECD 290°C)
- Corrente: 1.0A
- Amplitude do pulso: 50V
- *Make up*: nitrogênio 30mL/min

Figura 5.6 - Cromatograma de um padrão de trihalometanos (1mg.L⁻¹) analisado por ECD

Fonte: Elaborada pelos autores.

Detector de nitrogênio-fósforo

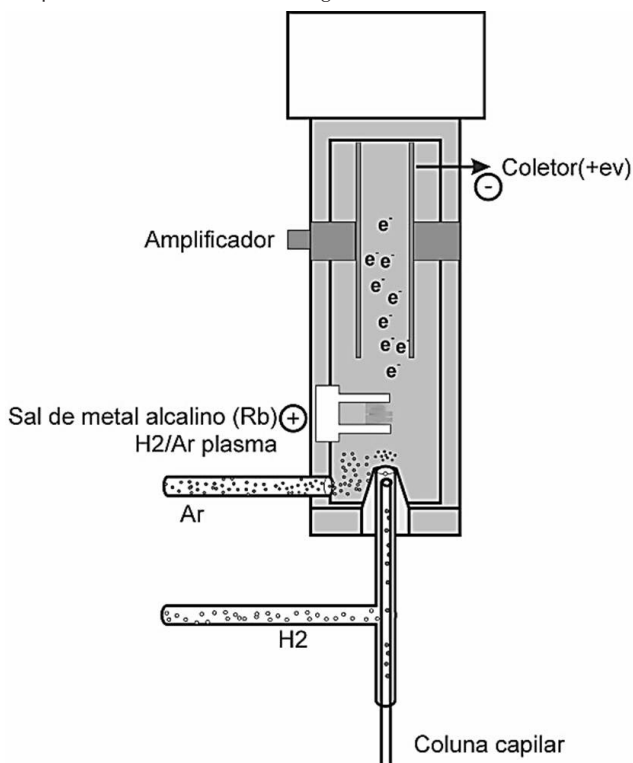
O detector de nitrogênio-fósforo (*nitrogen phosphorous detector* - NPD) possui uma resposta linear seletiva para os compostos orgânicos que contêm nitrogênio (N) e/ou fósforo (P). Devido à sua seletividade e sensibilidade, o NPD é, muitas vezes, usado na análise de pesticidas, drogas e outros vestígios de compostos. O uso de nitrogênio ou hélio de alta pureza é necessário.

A estrutura do NPD é semelhante à do FID, exceto pelo fato de possuir uma pérola termonuclear para gerar íons em um plasma de hidrogênio-ar. Da mesma forma que o FID, o NPD usa um jet de aço inoxidável para transportar gás efluente e hidrogênio para o detector. A pérola do NPD está posicionada entre o jet e o eletrodo coletor. A pérola é revestida com um metal alcalino (sal de rubídio ou césio) que promove a ionização de compostos que contêm nitrogênio ou fósforo. Hidrogênio e fluxos de ar criam um plasma em torno da pérola aquecida. Quando as moléculas contendo nitrogênio ou fósforo entram no plasma

a partir da coluna e do orifício do jet, elas passam por uma reação química de superfície catalítica, produzindo elétrons. Como resultado, íons são atraídos para um eletrodo coletor, carregado positivamente e amplificado para um sistema de dados. A Figura 5.7 mostra um esquema típico do NPD.

O NPD tem sido utilizado em diferentes pesquisas envolvendo análise de pesticidas organoclorados e organofosforados. Baixos limites de detecção (10ng.L^{-1}) foram alcançados por Milhorne et al. (2011), utilizando microextração em fase sólida (SPME) com o NPD para análise de 8 pesticidas em água.

Figura 5.7 - Esquema de um detector de nitrogênio-fósforo



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

A Tabela 5.3 resume as principais características do detector de nitrogênio-fósforo.

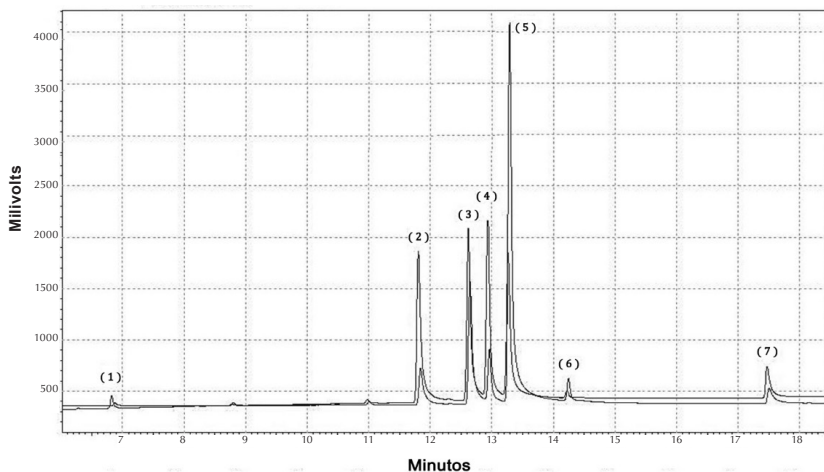
Tabela 5.3 - Características do detector de nitrogênio-fósforo

| | |
|-------------------------|--|
| Alta resposta | Compostos orgânicos nitrogenados ou fosforados |
| Sensibilidade | 1pg |
| Gases | Combustão- Hidrogênio e ar; Arraste e Make up: Nitrogênio ou Hélio |
| Temperatura do Detector | 250-300°C |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na Figura 5.8, temos um cromatograma de análise dos pesticidas (1) Molinato, (2) Paration Metil, (3) Fenitrotion, (4) Malation, (5) Clorpirifós (6), Pendimentalina e (7) Triazofós:

Figura 5.8 - Cromatograma da determinação de pesticidas usando o NPD



Fonte: Elaborada pelos autores.

Detector de condutividade térmica

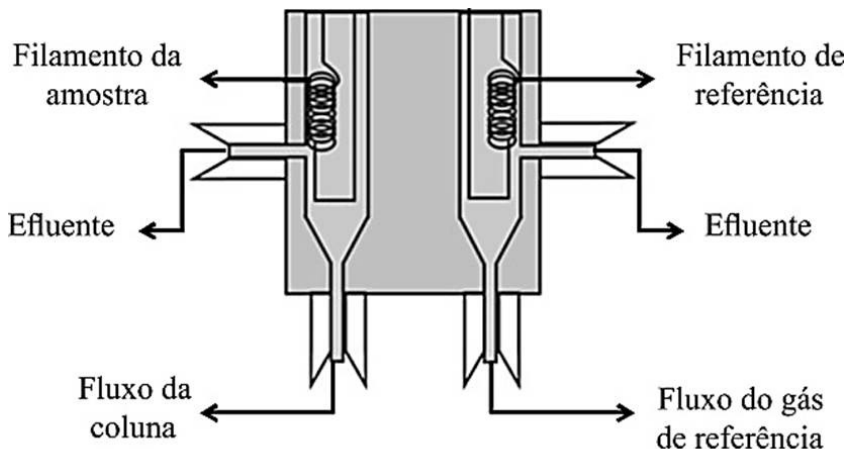
Os primeiros sistemas cromatográficos eram equipados com detector de condutividade térmica (*thermal conductivity detector - TCD*), que ainda são usados para análise de compostos, tais como H_2O , CO , CO_2 , H_2S , SO_2 , NO e NO_2 .

O TCD mede a diferença de condutividade térmica entre o gás de arraste contendo o analito e o gás de arraste puro. A condutividade térmica, que é característica de cada material, representa a propriedade de transmissão de calor quando submetido a uma diferença de temperatura.

O corpo do detector é aquecido, e pequenos filamentos são acoplados no interior de uma câmara em dois canais de fluxo (formando uma ponte de Wheatstone), em que um é o canal de referência, e o outro, o canal analítico. O esquema do detector e seu mecanismo de funcionamento podem ser observados nas Figuras 5.9 e 5.10.

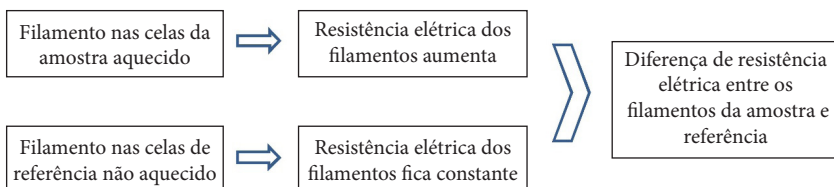
O circuito é balanceado com um fluxo de gás de arraste puro através de ambos os canais de fluxo do detector, onde os filamentos aquecidos perdem calor de maneira constante devido à passagem do gás de arraste pelas celas. Tal perda de calor gera um sinal constante que é registrado na forma de linha de base. Quando moléculas do soluto passam pelo canal de amostra, a condutividade térmica do meio é modificada, e a temperatura do filamento muda com uma mudança correspondente da resistência, ou seja, a perda de calor procede em uma menor velocidade. Esse acontecimento desestabiliza o circuito, e é essa instabilidade que forma os picos do cromatograma.

Figura 5.9 - Esquema de um detector de condutividade térmica



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

Figura 5.10 - Mecanismo de funcionamento do detector



Fonte: Elaborada pelos autores.

Um grande cuidado que se deve ter com o uso desse detector é o de não passar a corrente pelo filamento sem que haja fluxo de gás no interior da câmara. Esse acidente promove a queima do filamento, que é um dos problemas de ocorrência mais comum nesse tipo de detector. A sensibilidade desse detector é consideravelmente menor do que a do FID. A sensibilidade depende da diferença entre a condutividade térmica do gás de arraste e a do componente a ser detectado (não devendo a condutividade ser a mesma para todos os componentes da mistura).

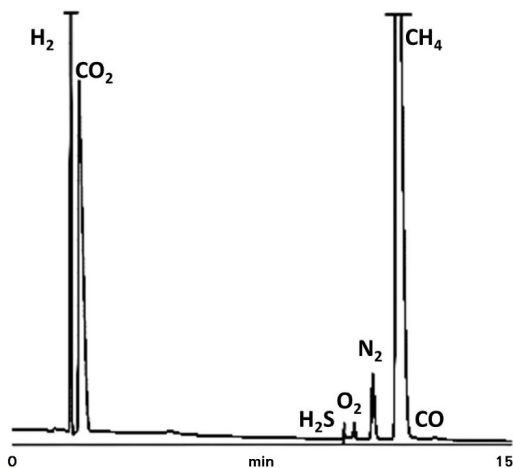
A maioria dos vapores orgânicos apresenta baixa condutividade térmica. A sensibilidade da análise é aumentada quando gases que possuem alta condutividade térmica são utilizados, caso do hélio e do hidrogênio, e é reduzida quando gases com baixa condutividade térmica são usados, como o argônio e o nitrogênio.

O TCD é classificado como não destrutivo, o que possibilita a recuperação da amostra na mesma forma química em que foi injetada, sendo útil para fins preparativos.

As melhores condições de operação para esse detector podem ser conseguidas utilizando-se um gás com alta condutividade térmica, o qual aumenta a temperatura do filamento e diminui a temperatura do bloco, reduzindo a vazão do gás de arraste.

A Figura 5.11 mostra um exemplo de análise de uma mistura padrão de biogás. Esse tipo de gás é importante para o monitoramento de gases produzidos em aterro sanitário e reatores anaeróbios (LAY; LI; NOIKE, 1998).

Figura 5.11 - Cromatograma de mistura padrão para biogás, obtido por CG-DCT. Condições cromatográficas: coluna: ID CP-Molsieve 13X, 1,5m x 1/8polegada; gás de arraste: argônio (1,86bar); injetor: 50°C; programa de temperatura: 50°C por 10min, aumenta 8°C/min até 90°C, mantém por 1min; detector: CG-DCT

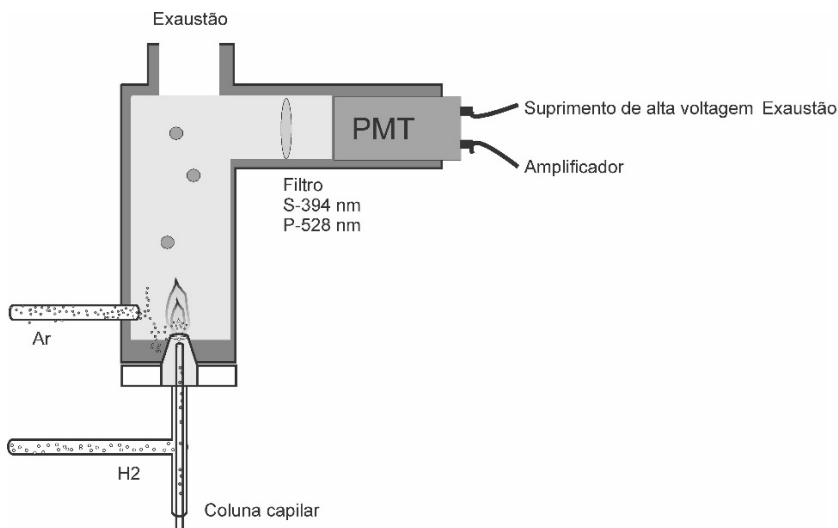


Fonte: Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/SI-01807.pdf>>.

Detector fotométrico de chama

Cromatografia gasosa (CG) acoplada a detector fotométrico de chama (*flame photometric detector - FPD*) é uma técnica usada para analisar compostos contendo enxofre ou fósforo. O FPD utiliza uma chama hidrogênio/ar, pela qual a amostra é passada. Os hidrocarbonetos contendo fósforo e enxofre geram quimioluminescência em comprimentos de onda específicos (enxofre = 394nm e fósforo = 526nm). Uma fotomultiplicadora recebe a radiação emitida pelos compostos excitados e converte em sinal elétrico que pode ser medido. Para proteção da fotomultiplicadora, o FPD opera em temperatura máxima de 250°C.

Figura 5.12 - Esquema de um detector fotométrico de chama



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

É necessário um gás de arraste com baixa impureza de água e oxigênio, pois estes compostos podem interagir com a fase estacionária e causar problemas significativos, como ruído da linha

de base do cromatograma ou “sangramento da coluna”, reduzindo a sensibilidade do detector e diminuindo a vida útil da coluna. O FPD é extremamente sensível a impurezas de hidrocarbonetos nos gases de suprimento para a chama. Impurezas de hidrocarbonetos também podem causar um aumento de ruído da linha de base e reduzir a sensibilidade do detector.

De maneira semelhante ao GC-FID, um gás *make up* pode ser utilizado na saída da coluna do GC-FPD para aumentar a taxa de fluxo para o detector. A Figura 5.12 e a Tabela 5.4 mostram as principais características do FPD. Uma calibração de rotina para controle do fluxo dos gases se faz necessária.

Tabela 5.4 - Características do detector fotométrico de chama

| | |
|-------------------------|--|
| Alta resposta | enxofre, fósforo, estanho, boro, arsênio, germânio, selênio, cromo |
| Sensibilidade | 100pg |
| Gases | Arraste - nitrogênio ou hélio Combustão - hidrogênio e ar sintético <i>Make up</i> - nitrogênio ou Hélio |
| Temperatura do detector | Até 250°C |

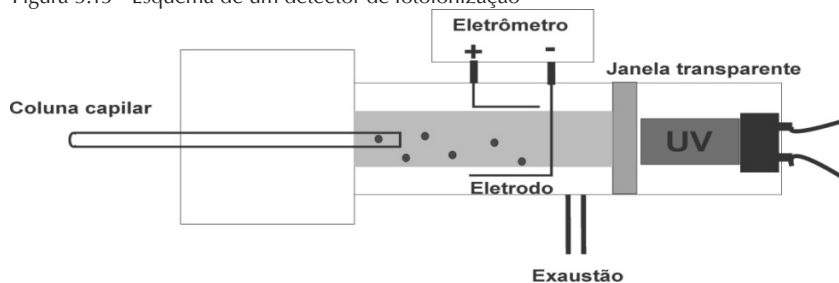
Fonte: Elaborada pelos autores.

Detector de fotoionização

O detector de fotoionização (*photoionization detector - PID*) é um sistema que utiliza fótons de alta energia, tipicamente na faixa ultravioleta (UV), para quebrar as moléculas em íons carregados positivamente, conforme ilustrado na Figura 5.13. Os compostos que são eluídos da coluna do CG são bombardeados por fótons de alta energia. A luz ultravioleta excita as moléculas, o que resulta em perda temporária de elétrons das moléculas e formação de íons carregados positivamente. Íons produzidos durante esse processo são coletados por eletrodos. A corrente gerada fornece uma medida da concentração do analito (> concentração de íons > corrente), uma

vez que apenas uma pequena fração das moléculas do analito é realmente ionizada. Esse método é considerado não destrutivo, permitindo que seja usado em conjunto com um outro detector para confirmar os resultados da análise.

Figura 5.13 - Esquema de um detector de fotoionização



Fonte: Adaptada de Chromoacademy (2015).

PIDs estão disponíveis em modelos portáteis, fornecendo resultados quase imediatos. Têm sido aplicados no monitoramento de compostos orgânicos voláteis no ar (EPA, 1994). Porém, elevada umidade pode reduzir a sensibilidade desse detector. Além disso, o PID é incapaz de responder a hidrocarbonetos de baixo peso molecular, tais como metano e etano. A Tabela 5.5 mostra as suas principais características.

Tabela 5.5 - Esquema de um detector de fotoionização

| | |
|-------------------------|--|
| Alta resposta | alifáticos, aromáticos, cetonas, ésteres, aldeídos, aminas, heterociclos, compostos organo-enxofre, alguns organometálicos |
| Sensibilidade | 2pg |
| Gases | nitrogênio ou hélio |
| Temperatura do detector | 250-350°C |

Fonte: Elaborada pelos autores.

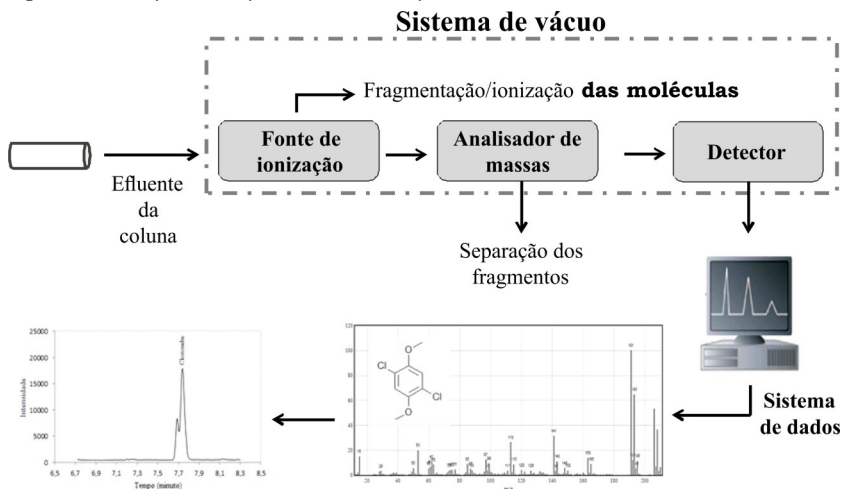
Detector de massas

O espectrômetro de massa (EM) é um instrumento analítico que tem sido bastante aplicado na solução de problemas analíticos e estruturais de compostos orgânicos. Ele é capaz de fornecer informações valiosas sobre compostos desconhecidos. Alguns casos são: (1) determinação da massa molecular de um composto; (2) análise da composição química de amostras complexas; (3) investigação da estrutura de produtos químicos; (4) verificação da pureza de substâncias; e (5) análise de isótopos. O EM tem vasto campo de aplicação na indústria e na pesquisa, em diversas áreas, tais como:

- Biotecnologia: análise de proteínas, peptídeos, nucleotídeos, polímeros.
- Farmacêutica: controle de qualidade de medicamentos, metabolismo de drogas.
- Clínica: fármacos, compostos no sangue e urina.
- Ambiental: HPAs, PCBs, BTEX, subprodutos de degradação, agrotóxicos, orgânicos voláteis para o controle da qualidade da água e ar.
- Alimentícia: voláteis em bebidas, contaminantes em frutas e vegetais, composição de ácidos graxos em alimentos.
- Geológica: HPAs, TPHs e agrotóxicos no solo.

A espectrometria de massas pode ser utilizada acoplada à cromatografia líquida (CL) ou cromatografia gasosa (CG). A CG-EM combina rapidez na análise, alta resolução, fácil operação, excelentes resultados quantitativos e qualitativos e custo moderado. A técnica exige que íons da amostra sejam gerados na forma gasosa, produzindo um espectro de massas característico do composto. De modo geral, os espectrômetros de massa são constituídos de três partes fundamentais: a fonte de ionização, o analisador e detector, conforme ilustrado na Figura 5.14.

Figura 5.14 - Esquema simplificado de um espectrômetro de massa

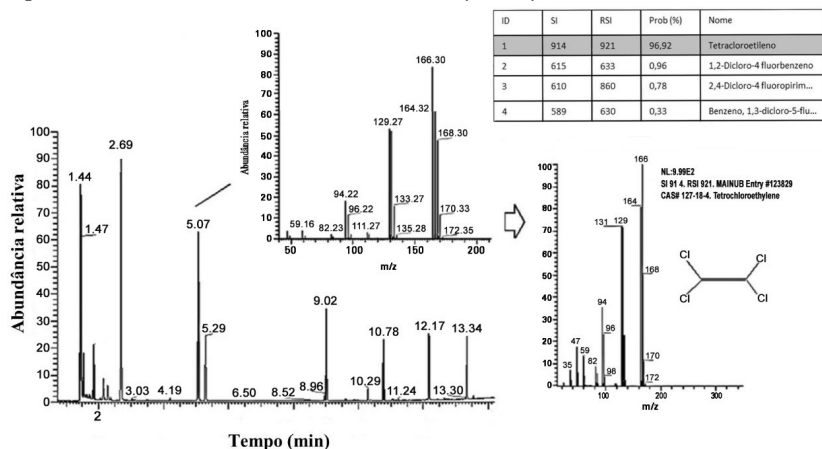


Fonte: Elaborada pelos autores.

A amostra é introduzida na fonte de ionização do instrumento, onde as moléculas são ionizadas. Os íons são transferidos para a região do analisador do espectrômetro de massa, sendo separados de acordo com a sua massa-carga (m/z) e transferidos ao detector. O analisador e o detector são mantidos sob alto vácuo (10^{-6} a 10^{-10} torr) para proporcionar aos íons uma maior facilidade de deslocamento de uma extremidade do instrumento à outra, por não haver impedimento das moléculas de ar.

O detector monitora a corrente de íons, amplifica-a, e, em seguida, o sinal é transmitido para o sistema de dados, sendo registrado na forma de espectros de massa, com os valores de m/z dos íons em função da sua intensidade. Muitos sistemas dispõem de um banco de dados (biblioteca), que possui os espectros de massa de mais de 100.000 compostos, com fragmentos gerados, comumente, pelo modo de ionização impacto de elétrons (EI), a ser descrito. A biblioteca permite a identificação da estrutura pela comparação entre os espectros do analito e os da sua base de dados, gerando uma probabilidade de confirmação da identidade do composto, conforme ilustrado na Figura 5.15.

Figura 5.15 - Identificação da estrutura do analito pelo espectro de massa



Fonte: Dados do software GCsolution.

Fonte de ionização

Muitos métodos de ionização estão disponíveis, e cada um tem suas vantagens e desvantagens. O método de ionização a ser usado dependerá do tipo de amostra em estudo e do espectrômetro de massa disponível. Temos os seguintes: impacto de elétrons (EI), ionização química (CI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), ionização por *electrospray* (ESI), bombardeamento atômico rápido (FAB), ionização por dessorção de campo (FD), ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz (MALDI), termopulverização ionização (TSP).

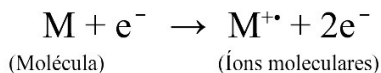
O método de ionização por impacto de elétrons (EI) é a técnica mais utilizada na produção de íons para espectrometria de massas, comumente em sistema de cromatografia gasosa. As moléculas do analito são bombardeadas na fase gasosa com elétrons de alta energia ($\sim 70\text{eV}$), removendo um elétron da molécula da amostra, formando um cátion radical, denominado de íon molecular. A energia excedente (em torno de 50eV) promove a fragmentação do íon molecular, produzindo o espectro de massa do composto. A intensi-

dade do íon molecular depende da sua estabilidade. Íons moleculares de compostos aromáticos são mais estáveis. A presença de substituintes afeta a fragmentação e diminui a intensidade do pico do íon molecular (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). A ordem decrescente de grupos que darão picos intensos do íon molecular é:

Aromáticos > alquenos conjugados > alicíclicos > sulfetos orgânicos > hidrocarbonetos não ramificados > cetonas > aminas > ésteres > éteres > ácidos carboxílicos > hidrocarbonetos ramificados > álcoois

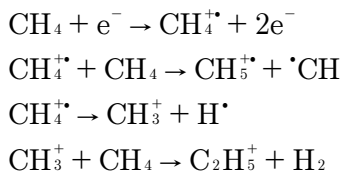
A quebra das ligações é característica dos grupos químicos citados. Dessa forma, as fragmentações se tornam previsíveis. Alguns bancos de dados mais acessíveis contêm informações de mais de 100.000 espectros de massa, permitindo a identificação rápida do composto durante a análise.

A ionização por impacto de elétrons leva com frequência a um elevado grau de fragmentação, o que dificulta a visualização do íon molecular. O aumento do tamanho da amostra ou a diminuição da voltagem aplicada podem aumentar a abundância relativa do íon molecular (M^+) (KITSON; LARSEN; MCEWEN, 1996; HARRIS, 2012), sendo a ionização representada da seguinte forma:



Outro modo de evitar esse problema é usar a técnica de “ionização branda”, entre as quais a ionização química (*chemical ionization* - CI) é a mais importante. No método CI, as moléculas da amostra na fase gasosa não são bombardeadas com elétrons de alta energia. Um gás reagente (comumente, metano, isobutano ou amônia) é introduzido na fonte e ionizado. Elétrons com ener-

gia suficiente (100-200eV) convertem o CH₄ em outros produtos, que são reativos:



As moléculas da amostra, sob pressão relativamente alta, colidem com as moléculas ionizadas do gás reagente (CH₅⁺, C₄H₉⁺ etc.) na fonte CI e sofrem ionização secundária por transferência de prótons para produzir íons [M⁺¹], [M⁺¹⁵], [M⁺²⁴], [M⁺⁴³], [M⁺¹⁸] ou [M⁻¹]. O excesso de energia transferido para as moléculas da amostra durante a ionização é pequeno (na ordem de 5eV), e, com isso, a fragmentação é muito menor. Isso ocasiona a alta abundância do íon molecular, porém há pouca informação sobre a estrutura do composto.

Durante a ionização da amostra, há a possibilidade de geração de íons positivamente ou negativamente carregados, dependendo da afinidade de prótons da amostra. Além disso, o analista deve associar o método de ionização adequado, dependendo do tipo de analisador.

Por exemplo, a ionização por MALDI é apropriada para analisadores TOF (descritos posteriormente), para análise de biomoléculas, especialmente proteínas. O desenvolvimento dessa técnica de ionização possibilitou a aplicação da espectrometria de massa para moléculas de alto peso molecular com uma maior precisão, sensibilidade e seletividade (CHEVALIER; SOMMERER, 2011).

Nesse método, a amostra é uniformemente misturada numa grande quantidade de matriz (em excesso molar), que absorve a energia de um feixe de *laser* (ultravioleta ou infravermelho pulsado) e converte em energia térmica. Uma parte da matriz é aquecida rapidamente e é vaporizada, em conjunto com a amostra, direcionando-se ao analisador.

Analísadores de massas

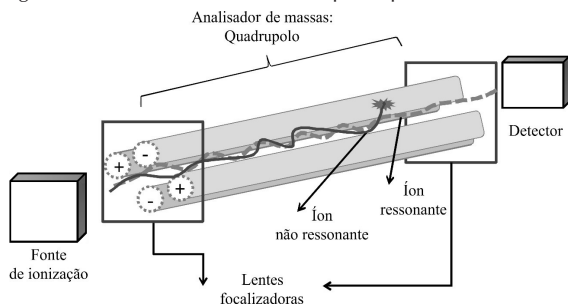
A principal função do analisador de massa é separar os íons formados na fonte de ionização do espectrômetro de massa de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). Há uma série de analisadores de massa disponíveis atualmente, incluindo: quadrupolo (Q), armadilha de íons (*ion trap -IT*), tempo de voo (TOF - do inglês *time of flight*), setor eletrostático (E) e setor magnético (B), ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR - do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance*).

Esses analisadores de massa têm características diferentes, incluindo a ampla faixa de m/z que pode ser investigada, a elevada precisão e a resolução. A compatibilidade dos diferentes aparelhos com diferentes métodos de ionização varia. Por exemplo, todos os analisadores listados acima podem ser utilizados em conjunto com a ionização por *electrospray*, enquanto a MALDI não está geralmente associada a um analisador de quadrupolo.

Analísador quadrupolo

Os analisadores quadrupolos são bastante populares em espectrometria de massas. São formados por quatro tubos cilíndricos metálicos paralelos, de 100-200mm de comprimento, montados segundo os vértices de um quadrado, conforme ilustrado na Figura 5.16.

Figura 5.16 - Analísador de massas quadrupolo



Fonte: Elaborada pelos autores.

O funcionamento do analisador é complexo, porém pode ser descrito de forma simplificada. Uma voltagem DC modificada por uma voltagem de radiofrequência é aplicada aos tubos. Os íons penetram no centro dos quatro cilindros e atravessam até chegar à outra extremidade. A variação de determinadas voltagens DC e radiofrequência promove a formação de campos elétricos oscilantes, nos quais somente alguns valores de m/z são estáveis e completam o percurso. Os outros íons (outros valores de m/z) apresentam oscilações erráticas e colidem uns com os outros, saindo da trajetória do detector. O quadrupolo funciona como um filtro. Isso permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector e, dessa forma, podem ser diferenciados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

As três principais características de um analisador de massas são: o limite superior de medida da razão m/z ; a transmissão, que é a razão entre o número de íons que alcançam o detector e o número de íons produzido na fonte; e o poder de resolução, que é a habilidade de produzir sinais distintos para dois íons com uma pequena diferença de massa.

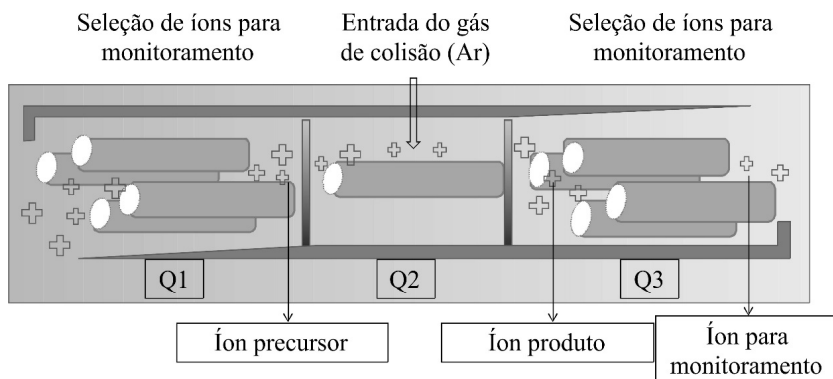
Na espectrometria de massas sequencial (Ms^n), em vez de se utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, como na MS, vários analisadores podem ser combinados em série. Um exemplo é a utilização de dois estágios de espectrometria de massas (MS-MS), sendo um deles usado para isolar o íon de interesse e o outro para estabelecer uma relação entre o íon de interesse isolado e outros íons que forem gerados a partir da sua decomposição induzida. Essa técnica é amplamente empregada na detecção de compostos em baixas concentrações, principalmente em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na sensibilidade e reduz a interferência espectral. Os analisadores combinados mais empregados são o triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo-analisador de tempo de voo (QToF) e quadrupolo-*ion trap* (Qtrap).

O espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ) é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, havendo uma

cela de colisão entre dois analisadores quadrupolos. A Figura 5.17 ilustra um sistema QqQ. No primeiro quadrupolo (Q_1), o íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte e passada por Q_0 .

No segundo quadrupolo (q), os íons de interesse são gerados por dissociação induzida por colisão (*CID*, do inglês *collision-induced dissociation*), ou seja, pela colisão de espécies iônicas moleculares com uma molécula de gás (geralmente argônio), em uma célula de colisão. Por último, o terceiro quadrupolo (Q_3) seleciona os fragmentos iônicos formados para enviar ao detector (HARRIS, 2012).

Figura 5.17 - Sistema de detector tripla quadrupolo (QqQ)



Fonte: Elaborada pelos autores.

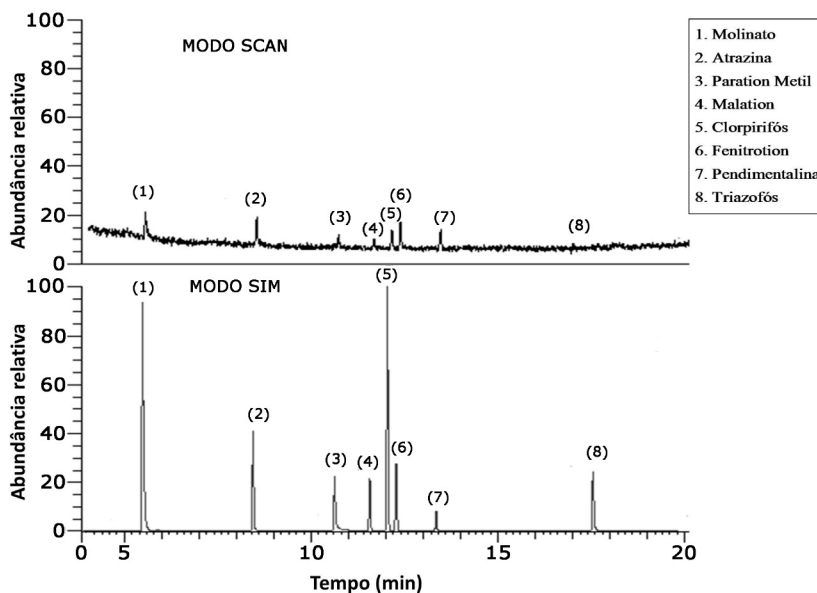
A análise dos resultados obtidos por espectrometria de massas pode ser realizada em diferentes modos: detecção por varredura (*full scan*), monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *single ion monitoring*), monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *selected reactions monitoring*) ou *monitoramento de reações múltiplas* (*multiple reaction monitoring - MRM*). O controle da função de aquisição de dados é extremamente importante, pois dele resultam os dados necessários à obtenção dos resultados analíticos.

Na detecção por varredura (*full scan*), a aquisição contínua do espectro total de massas é programada de forma a analisar

todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z . O monitoramento seletivo de íons (SIM) e o monitoramento seletivo de reações (SRM) aumentam a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhoram a sensibilidade, diminuindo a resposta do instrumento a tudo que interfira na medida, isto é, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2012). Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, esse modo de varredura é denominado monitoramento de reações múltiplas (MRM) (CHIARADIA et al., 2008).

A Figura 5.18 mostra a diferença de sensibilidade de 8 pesticidas multiclases na análise no modo *full scan* e SIM.

Figura 5.18 - Diferença de sensibilidade entre modo full scan (varredura) e modo SIM de 8 pesticidas (0,1mgL⁻¹) usando GC-MS quadrupolo



Fonte: Elaborada pelos autores.

No modo SIM, são selecionados os principais fragmentos de maior intensidade no espectro e são monitorados em intervalos próximos ao tempo de retenção do composto, o que aumenta a resposta do detector. No modo de operação SRM, o espectrômetro é programado de forma a que os íons precursores são separados e fragmentados no modo MS/MS, e os íons produtos são usados na identificação e quantificação. É extremamente útil quando a separação não é completa. Pelo modo SRM, é possível analisar multianálitos dentro de uma mesma análise, pois ele permite a identificação e separação de cada transição monitorada, apresentando como principal vantagem a seletividade.

Uma grande variedade de compostos pode ser determinada por detector de espectrometria de massas com analisador quadrupolo. Um exemplo são os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs), que são contaminantes derivados do petróleo e que podem estar presentes na água. Eles são poluentes ambientais comuns, devido a derrames industriais e vazamentos de tanques de armazenamento. As águas subterrâneas, águas residuais e o solo são analisados para investigação do teor de TPHs. O cromatograma da Figura 5.19 foi obtido usando um GC-MS equipado com analisador quadrupolo.

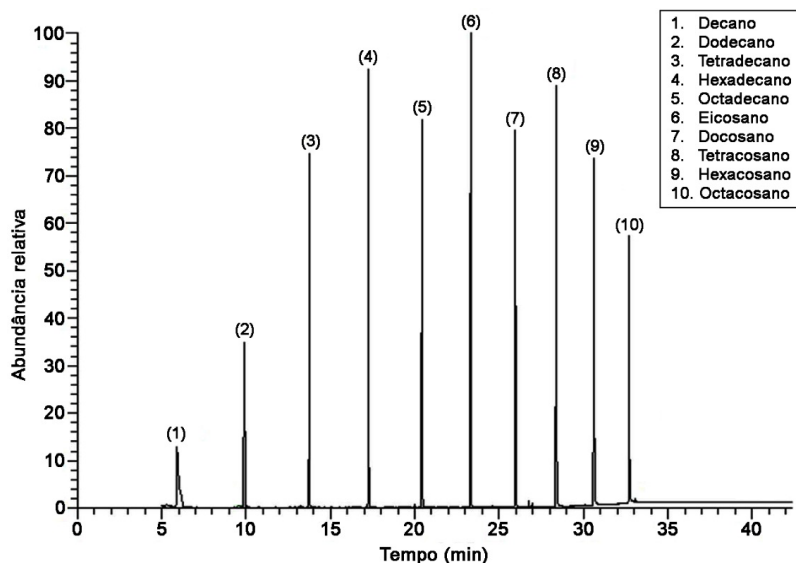
Outro tipo de contaminante ambiental são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são produzidos através do processo de combustão. São poluentes orgânicos de grande persistência (POP) ambiental, e muitos deles e seus derivados são potencialmente carcinogênicos e/ou mutagênicos. Análise de HPAs tem sido satisfatoriamente realizada por GC-MS, como mostra o Cromatograma da Figura 5.20.

A espectrometria de massas também tem grande aplicação no controle do nível de agrotóxicos em matrizes ambientais e alimentícias por meio de métodos multirresíduos. Os órgãos ambientais de controle desses resíduos exigem limites (*maximum residue limits - MRLs*) cada vez menores, o que demanda técnicas de elevada sensibilidade para análise qualitativa e quantitativa, como

a EM acoplada a quadrupolo simples (*single quadrupole - SQ*) (SOUSA et al., 2013). A confirmação da identidade do composto por meio do espectro de massa é fundamental para evitar a presença de falso-positivo.

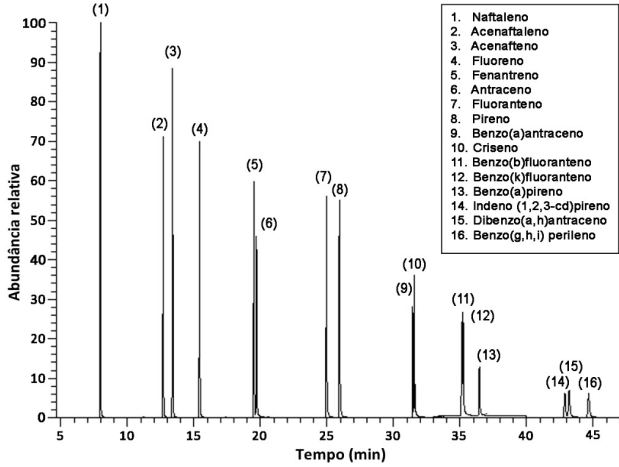
O cromatograma na Figura 5.21 mostra um exemplo de método multirresíduo para análise de 13 agrotóxicos de diferentes classes usando GC-MS-Quadrupolo. Métodos para monitoramento de mais de 100 tipos de princípios ativos por espectrometria de massas com diferentes analisadores têm sido reportados recentemente (KOESUKWIWAT et al., 2010; LESUEUR et al., 2008, DONG et al., 2008).

Figura 5.19 - Cromatograma de íons totais - TIC, padrão de TPHs (5mg.L⁻¹), obtido por GC-SQ/MS, modo *full scan* (*mz* 50-600). Condições cromatográficas: coluna: DB5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm; gás de arraste: hélio (1mL/min); injetor: *splitless* (1min), 250°C; programa de temperatura: 70°C por 1min, aumenta 7°C/min até 290°C, mantém por 10min; detector: GC-SQ/MS, interface 290°C, fonte de ionização: 250°C



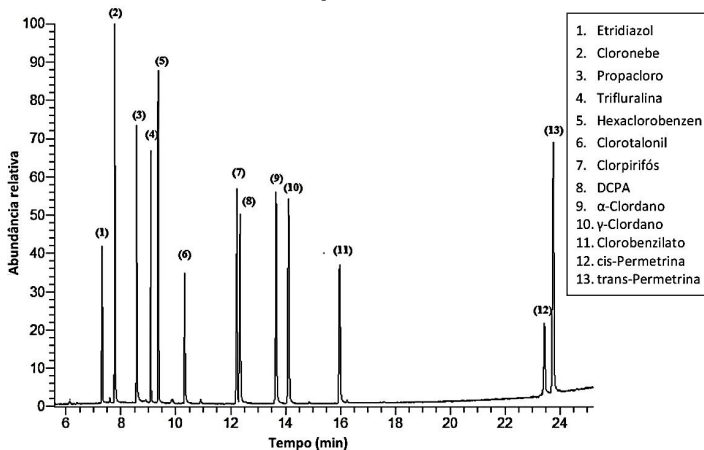
Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 5.20 - Cromatograma de íons totais -TIC, padrão de 16 HPAs (5 mg.L⁻¹), obtido por GC-SQ/MS, modo *full scan* (*mz* 50-600). Condições cromatográficas: coluna: DB5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm; gás de arraste: hélio (1mL/min); injetor: *splitless* (1min), 250°C; programa de temperatura: 50°C (2min), 30°C/min até 120°C, 5°C/min até 250°C e 20°C/min até 280°C (20min); detector: interface 230°C, fonte de ionização: 200°C



Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 5.21 - Cromatograma de íons totais - TIC, padrão de 13 pesticidas (5 mg.L⁻¹), obtido por GC-SQ/MS, modo *full scan* (*mz* 50-430). Condições cromatográficas: coluna: DB5 30m x 0,25mm ID x 0,25µm; gás de arraste: hélio (1mL/min); injetor: *splitless* (1min), 250°C; programa de temperatura: 100°C (1min), 15°C/min até 180°C e 4°C/min até 280°C (1min); detector: interface 280°C, fonte de ionização: 200°C



Fonte: Elaborada pelos autores.

Analizador armadilha de íons

Introduzido comercialmente na década de 80, o espectrômetro de massas por armadilha de íons (*ion trap - IT*) é considerado uma variação da tecnologia do quadrupolo. Wolfgang Paul e os colaboradores Hans Dehmelt e Hans Steinwedel ganharam o Prêmio Nobel de Física, em 1989, pelo desenvolvimento da tecnologia IT. Instrumentos comerciais IT são hoje muito comuns em Química, Bioquímica e em laboratórios forenses, podendo ser acoplados à cromatografia líquida ou gasosa (MARCH; TODD, 2005).

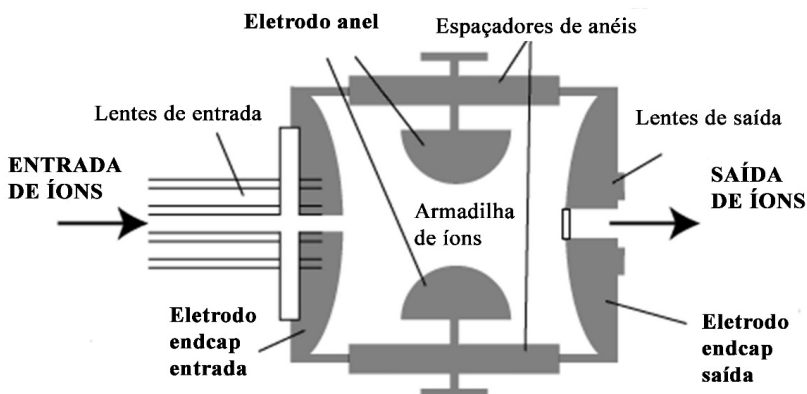
O princípio do funcionamento de um analisador IT está baseado na criação de trajetórias estáveis para os íons de certa m/z , ou de uma faixa de m/z , enquanto os íons indesejáveis são removidos por colisão com a parede ou por ejeção axial do *trap* devido à instabilidade de trajetórias. Ao contrário do quadrupolo, que age como um filtro de íons, o IT é capaz de aprisionar íons por tempos relativamente longos e liberá-los em sequência para um detector.

Os íons produzidos na fonte do instrumento entram na armadilha e são aprisionados pela ação de três eletrodos hiperbólicos: o *endcap* entrada, o anel e o *endcap* saída. Os eletrodos são separados por dois anéis espaçadores, em posição adequada, que servem como isoladores elétricos.

Várias tensões são aplicadas a esses eletrodos, o que resulta na formação de uma cavidade em que os íons são capturados. O potencial de radiofrequência (RF) do eletrodo anel, associado a uma voltagem AC e uma voltagem DC, produz um campo magnético quadrupolar 3D dentro da armadilha, que mantém os íons em uma trajetória oscilante estável. O movimento exato dos íons é dependente das tensões aplicadas e das proporções de m/z . Para a detecção dos íons do analito, os potenciais são alterados para desestabilizar os movimentos de íons, resultando na ejeção dos íons através do *endcap* saída. Os íons são direcionados ao detector do instrumento para produzir o espectro de massa.

Um esquema típico do analisador *ion trap* é mostrado na Figura 5.22.

Figura 5.22 - Seção transversal de um analisador de armadilha de íons (IT)

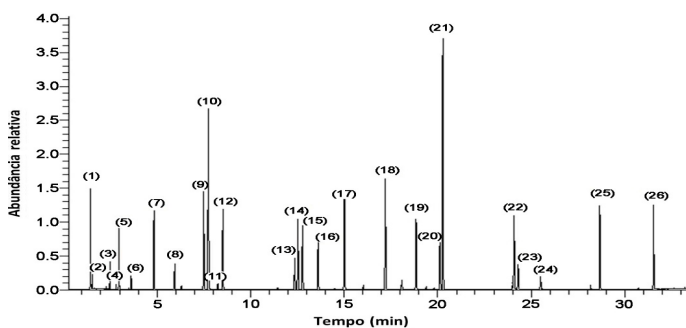


Fonte: Elaborada pelos autores.

Entre as principais vantagens do IT, temos: possui alta sensibilidade no modo *full scan*, sendo bastante indicado para análises qualitativas; é um sistema robusto de fácil operação e alta eficiência; apresenta a possibilidade de análises sequenciais (M_s^n). Como desvantagens, podemos citar: baixa precisão para massas elevadas ($m/z > 1000$); possibilidade de formação de fragmentos $[ion + 1]$, tornando difícil a comparação dos espectros obtidos durante a análise com os espectros da biblioteca.

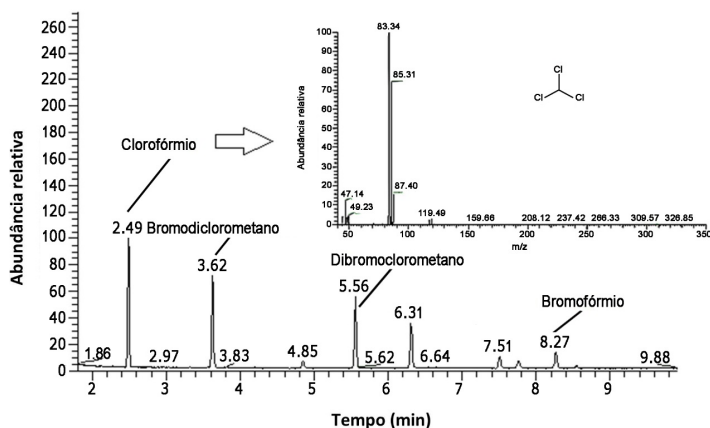
Análises com IT têm sido úteis em programas de monitoramento para investigação da estrutura de resíduos de contaminantes orgânicos e seus metabólitos em diversas matrizes, tanto acoplado à cromatografia líquida quanto à gasosa (INOUE et al., 2003; HIRAHARA et al., 2006; SOLER; MAÑES; PICÓ, 2004). A Figura 5.23 mostra um exemplo de análise de compostos orgânicos voláteis frequentemente monitorados para o controle da qualidade de águas. Um exemplo de análise de uma amostra contendo trihalometanos, com a confirmação da identidade do composto através do espectro de massa, é mostrado na Figura 5.24.

Figura 5.23 - Cromatograma de íons totais - TIC, padrão de 26 orgânicos voláteis ($0,1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), obtido por GC-MS-*ion trap*, modo *full scan* (mz 40-350). Condições cromatográficas: coluna: TR5-ms SQC 30m x 0,25mm ID x 0,25 μm ; gás de arraste: hélio ($1\text{mL}/\text{min}$); programa de temperatura: 35°C (1 min), $4^\circ\text{C}/\text{min}$ até 130°C e $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até 220°C (1min); injetor: 180°C , autoamostrador *headspace* (70°C , agitação, 15min). **1.** Cloreto de vinila; **2.** 1,1-Dicloroetileno; **3.** Clorofórmio; **4.** 1,2-Dicloroetano; **5.** Benzeno; **6.** Bromodiclorometano; **7.** Tolueno; **8.** Dibromoclorometano; **9.** Etil Benzeno; **10.** m+p Xileno; **11.** Bromofórmio; **12.** o-Xileno; **13.** Pentacloroetano; **14.** 1,3-Diclorobenzeno; **15.** 1,4-Diclorobenzeno; **16.** 1,2-Diclorobenzeno; **17.** Hexacloroetano; **18.** 1,3,5-Triclorobenzeno; **19.** 1,2,4-Triclorobenzeno; **20.** 1,2,3-Triclorobenzeno; **21.** Hexaclorobutadieno; **22.** 1,2,4,5-Tetraclorobenzeno; **23.** Hexaclorociclopentadieno; **24.** 2-Cloronaphthyleno; **25.** Pentaclorobenzeno; **26.** Hexaclorobenzeno



Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 5.24 - Cromatograma TIC (*full scan*) de amostra de água contendo resíduos de trihalometanos e identificação através do espectro de massa do clorofórmio



Fonte: Elaborada pelos autores.

Analizador por tempo de voo

A espectrometria de massa por tempo de vôo (*time-of-flight* - *TOF*) tem sido o método mais indicado para a análise de biomoléculas, associado com a técnica de ionização por MALDI, a qual permite que moléculas grandes se ionizem, evitando sua fragmentação.

Um analisador tipo TOF baseia-se na aplicação de um potencial (V) que acelera os íons que passam por um tubo até o detector.

O detector tempo de vôo acoplado à espectrometria de massa (TOF-MS) é um método em que a proporção de um íon de massa-para-carga é determinada por uma medição de tempo. Os íons são acelerados por um campo elétrico de força conhecida e passam por um tubo até o detector. A velocidade do íon depende da razão massa-carga. Se os íons entram no tubo com a mesma energia, então, íons com massas diferentes terão velocidades diferentes (partículas mais pesadas terão velocidades mais baixas). A partir desses parâmetros conhecidos, pode-se encontrar a relação massa-carga do íon.

Conhecendo a tensão de aceleração e o comprimento das duas regiões de voo, a razão m/z dos íons pode ser determinada medindo-se o tempo de voo dos íons, de acordo com as seguintes equações:

$$E = \frac{1}{2} MV^2 \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$T = t_d + t_L \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$T = (2d + L) \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

Em que: m e q são a massa e a carga do íon; U é a tensão de aceleração; d e L são os comprimentos das regiões de aceleração e de voo livre; e t_d e t_L são, respectivamente, os tempos de voo dos íons nas duas regiões citadas.

Apesar da grande aplicação, instrumentos TOF não são tão populares como analisadores de quadrupolo.

O progresso recente na instrumentação tem aumentado o uso de analisadores de massa de tempo de voo acoplado a CG para análise de pesticidas nos alimentos (CERVERA et al., 2012).

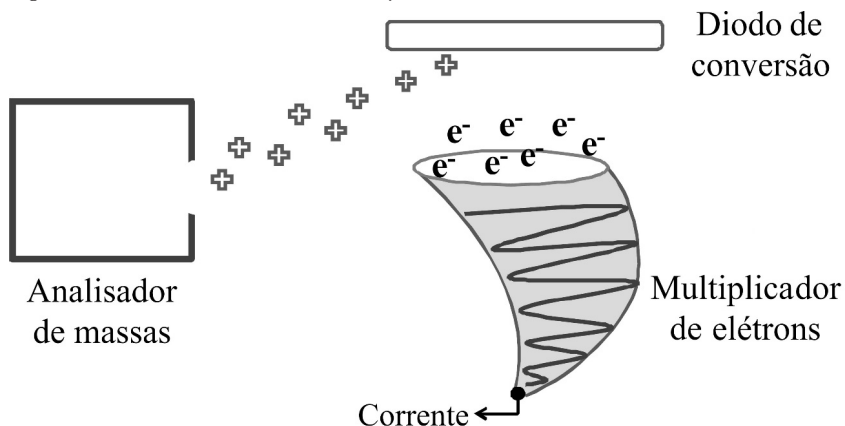
Detectores

Os íons, após a passagem pelo analisador de massas, alcançam o detector, que gera um sinal correspondente. O detector tem a função de detectar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferir o sinal para o sistema de processamento de dados. Os principais tipos são: fotomultiplicador, multiplicador de elétrons e *microchannel plate* (MCP).

O detector depende do tipo de analisador. O fotomultiplicador e o multiplicador de elétrons são utilizados com analisadores quadrupolos, setor magnético e *ion trap* e apresentam faixa dinâmica ampla, enquanto que o MCP é utilizado com analisadores TOF e apresentam resposta extremamente rápida e com alta sensibilidade.

O multiplicador de elétrons, como mostra a Figura 5.25, funciona pela emissão de elétrons secundários produzidos por dinodos quando os íons provenientes dos analisadores chocam-se com eles. Os íons, ao atingirem a primeira placa, ou eletrodo conversor, dão origem a elétrons secundários. Estes são acelerados e focados em um segundo dinodo, dando origem a uma segunda e mais numerosa geração de elétrons e assim por diante. Os dinodos são conectados a potenciais sucessivamente maiores. Existem multiplicadores de elétrons com até 20 dinodos que produzem ganhos de corrente da ordem de 10^7 .

Figura 5.25 - Ilustração do detector multiplicador de elétrons

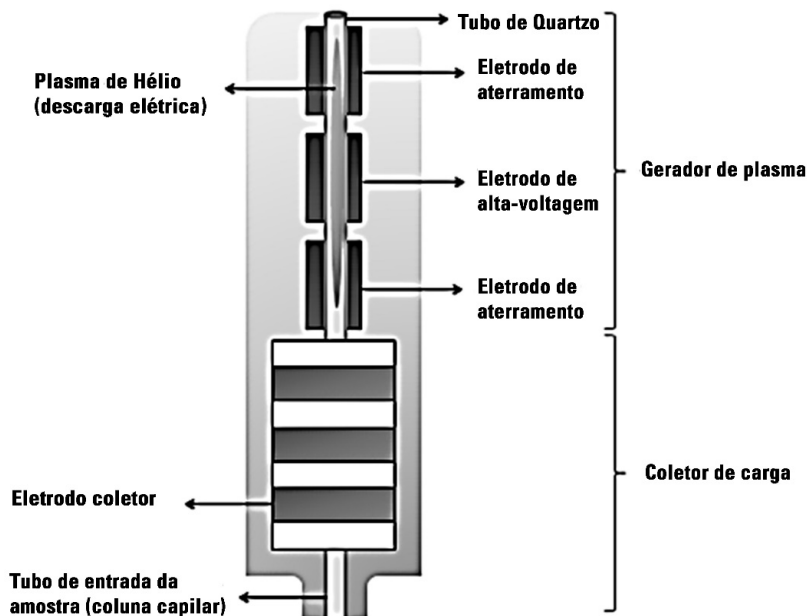


Fonte: Elaborada pelos autores.

Detector de ionização de descarga de barreira dielétrica - BID

O detector de ionização de descarga de barreira (BID) é o dispositivo mais moderno desenvolvido para análises de traço de ampla faixa de compostos (detector universal), possuindo sensibilidade 100 vezes superior ao TCD e duas vezes superior ao FID. O BID é um aparato altamente sensível que, por meio de ionização à base de plasma de hélio, cria uma descarga de barreira dielétrica. Um plasma de 17,7eV é gerado pela aplicação de uma alta tensão dielétrica de uma câmara de quartzo, na presença de hélio, a uma temperatura relativamente baixa. Os compostos que eluem da coluna de CG são ionizados pela energia de plasma de hélio. Em seguida, eles são detectados pelo eletrodo coletor, e os picos são gerados (SHINADA et al., 2012). A Figura 5.26, a seguir, ilustra as partes do detector.

Figura 5.26 - Esquema representativo do detector de descarga de barreira - BID



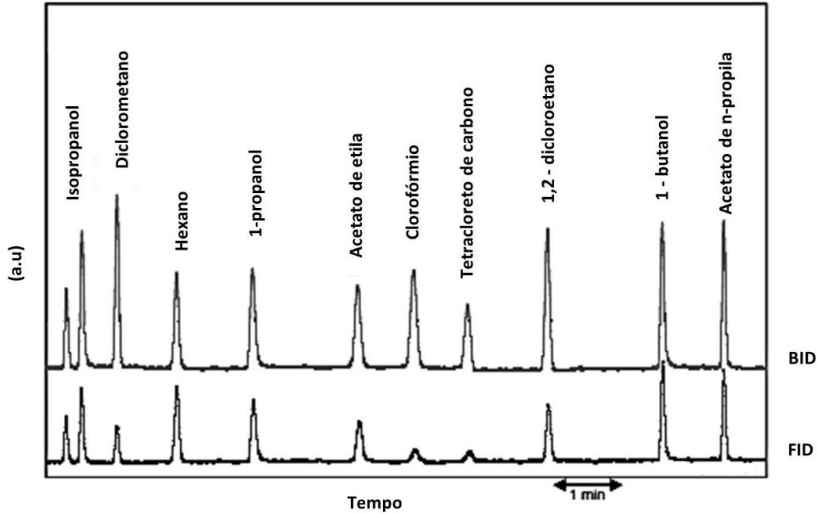
Fonte: Elaborada pelos autores.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com o emprego desse detector, entre os quais, podemos citar: Weatherly, Woods e Armstrong (2014), que realizaram um estudo comparativo dos detectores BID e TCD para determinação de água e etanol em produtos comerciais; Frink, Weatherly e Armstrong (2014), na determinação de água em ingredientes farmacêuticos; e Pena-Pereira et al. (2014), na determinação de longéis à base de sílica.

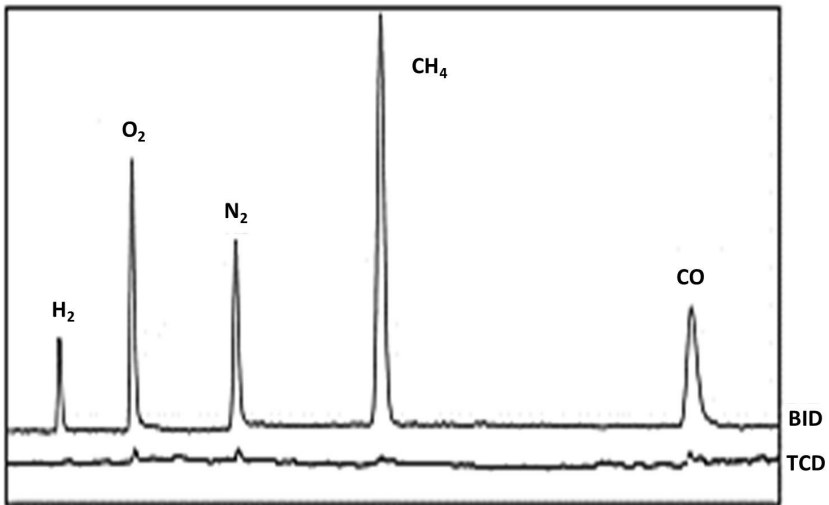
O BID, em comparação com outros detectores, demonstrou ser bastante sensível. A Figura 5.27 ilustra graficamente essa característica pela análise de desempenho de dois outros detectores, FID e TCD. A Tabela 5.6 mostra as principais características do BID.

Figura 5.27 - Cromatograma ilustrando a sensibilidade do BID em relação aos detectores FID (a) e TCD (b)

(a) Comparação do uso dos detectores BID e FID em análise de hidrocarbonetos:



(b) Comparação do uso dos detectores BID e TCD em análise de gases:



Fonte: Adaptada de Shimadzu Corporation (2007).

Tabela 5.6 - Esquema de um detector de descarga de barreira dielétrica

| | |
|-------------------------|---|
| Faixa dinâmica | 10 ⁶ |
| Sensibilidade | 1 pgC/s (dodecano, fluxo de descarga do gás 50mL/min) |
| Gases | Hélio (99,9999% ou maior pureza) |
| Temperatura do detector | Acima de 350°C |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Referências bibliográficas

AGILENT. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/SI-01807.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2017.

CERVERA, M. I. et al. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 1244, p. 168-177, 2012.

CHEVALIER, F.; SOMMERER, N. Analytical methods: mass spectrometric methods. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2. ed. 2011. p. 198-205.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 3, 2008.

CHROMOACADEMY. 2015. Disponível em: <<http://www.chromacademy.com/gc-training.html>>. Acesso em 25 nov. 2015.

CONCHA-GRÑÑA, E. et al. A study of large-volume on-column injection GC-ECD for the ultratrace analysis of organochlorine pesticides in water. *Talanta*, v. 78, n. 3, p. 764-771, 2009.

EPA. *Photoionization detector (PID) HNU*. SOP 2114. 1994. Disponível em: <<http://www.dem.ri.gov/pubs/sops/wmsr2114.pdf>>. Acesso em: 7 mar. 2015.

FRINK, L. A.; WEATHERLY, C. A.; ARMSTRONG, D. W. Water determination in active pharmaceutical ingredients using ionic liquid headspace gas chromatography and two different detection protocols. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 94, p. 111-117, 2014.

FURLANI, R. P. Z. et al. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry*, v. 126, n. 3, p. 1283-1287, 2011.

HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HIRAHARA, Y. et al. Screening method for the determination of 199 pesticides in agricultural products by gas chromatography/ion trap mass spectrometry (GC/MS/MS). *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, v. 47, n. 5, p. 213-21, 2006.

INOUE, T. et al. Determination of low-level pesticide residues in agricultural products by ion-trap GC/MS/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, v. 44, n. 6, p. 310-5, Dec. 2003.

JENNINGS, W.; MITTFELDLT, E.; STREMPLE, P. *Analytical gas chromatography*: second edition. Academic Press, 1997.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. *Gas chromatography and mass spectrometry*. San Diego: Academic Press, 1996.

KOESUKWIWAT, U. et al. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6692-6703, 2010.

LESUEUR, C. et al. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, v. 19, p. 906-914, 2008.

ŁOZOWICKA, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 97, p. 210-222, nov. 2013.

MARCH, R. E.; TODD, J. F. J. *Quadrupole ion trap mass spectrometry*: second edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, 2005. (Chemical Analysis, v. 165).

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography*: techniques in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1997.

MILHOME, M. A. L. et al. Multiresidue methods for determination of pesticides using SPME and SPE followed by GC-NPD system: a comparative study. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 22, n. 11, p. 2048-2055, nov. 2011.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 110, p. 207-213, 2008.

NIKOLAOU, A. D. et al. Determination of haloacetic acids in water by acidic methanol esterification-GC-ECD method. *Water Research*, v. 36, n. 4, p. 1089-1094, 2002.

PENA-PEREIRA, F. et al. Silica-based ionogels: nanoconfined ionic liquid-rich fibers for headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-barrier discharge ionization detection. *Anal. Chem.*, v. 86, n. 23, p. 11640-11648, 2014.

PEREIRA, R. F. R. et al. Comparative study of chemical constituents in sugar cane spirits from Brazil and Cape Verde. *African Journal of Food Science*, v. 6, n. 17, p. 427-440, 2012.

SCHOFIELD, K. The enigmatic mechanism of the flame ionization detector: its overlooked implications for fossil fuel combustion modeling. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, n. 3, p. 330-350, June 2008.

SHIMADZU CORPORATION. 2007. Disponível em: <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/gc/tracera-3.shtml>; <http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/gc/tracera-2.shtml>>. Acesso em: 29 nov. 2015.

SHINADA, K. et al. Development of news ionization detector for gas chromatography by applying dielectric barrier discharge. *Shimadzu Review*, Dec. 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. Liquid chromatography-electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A*, v. 1048, n. 1, p. 41-49, 2004.

SOUSA, J. S. et al. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2675-2681, 2013.

WEATHERLY, C. A.; WOODS, R. M.; ARMSTRONG, D. W. Rapid analysis of ethanol and water in commercial products using ionic liquid capillary gas chromatography with thermal conductivity detection and/or barrier discharge ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 8, p. 1832-1838, 2014.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

Vítor Paulo Andrade da Silva

Ari Clecius Alves de Lima

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Validação de métodos analíticos e sua importância

*V*alidação, conforme definição da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, é “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005a). A validação de métodos analíticos é um importante requerimento técnico-científico em todas as atividades relacionadas à química analítica (EURACHEM, 1998). Na literatura, existe uma variedade de definições sobre *validação de métodos*, porém os conceitos estão constantemente sofrendo refinamentos e evoluindo conforme adequações estabelecidas pelas agências reguladoras. Podemos apresentar aqui alguns conceitos

convenientes para definir objetivamente a validação de métodos de análise química:

Validação de métodos analíticos é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método considerado tem capacidade de desempenho consistente com o requerimento da aplicação (EURACHEM, 1998).

A validação do método deve garantir, por meios experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A validação de um método analítico inclui testes de suas características importantes. O objetivo final é estar certo que o processo de análise é confiável e preciso, permanece sob total controle do operador (analista) e conduz a resultados confiáveis (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

Observamos, de maneira clara, que as definições acima, que podem diferir sutilmente quanto aos termos empregados, em essência, esclarecem que a validação de um método analítico nada mais é que *o processo de comprovação experimental da capacidade deste método de gerar resultados tecnicamente confiáveis, relacionados com a concentração da espécie ou espécies químicas na amostra, quando empregado dentro de seu escopo de aplicação*. Várias instituições competentes em todo o mundo, como agências de regulação ligadas aos governos ou mesmo organizações e laboratórios de pesquisa, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil, a *United States Pharmacopeia* (USP) nos Estados Unidos e o *Eurachem Working Group* na Europa, produzem e publicam normas, resoluções e guias com orientações relativas à validação de métodos analíticos. Devemos esclarecer que as resoluções possuem força de lei, devendo ser obedecidas fielmente, enquanto os guias são apenas documentos de orientação, havendo liberdade para que o analista faça interpretações e adaptações conforme sua condição de trabalho.

Do ponto de vista legal, técnico e comercial, há fortes razões para a implantação da validação de métodos analíticos, porém, no âmbito nacional e internacional, não há uma norma que estabeleça diretrizes unificadas para as atividades de validação de métodos. Modernamente, para comprovar sua competência técnica, os laboratórios devem passar pelo processo de credenciamento ou “acreditação” junto a órgãos competentes na esfera nacional ou internacional (RIBANI et al., 2004). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) são atualmente as instituições competentes credenciadoras para verificar a proficiência dos laboratórios de ensaio. O Inmetro disponibiliza guias de orientação para validação de métodos, como o documento DOQ-CGCRE-008, que apresenta diversas revisões. Já a Anvisa possui a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003, que aborda as diretrizes para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Com o intuito de harmonizar as divergências de conceitos e de procedimentos de validação de métodos no campo das aplicações farmacêuticas, a Conferência Internacional de Harmonização (*ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), constituída por representantes de órgãos reguladores e indústrias dos Estados Unidos, Europa e Japão, concebeu guias definindo parâmetros, requisitos e metodologias para validação (RAVICHANDRAN et al., 2010; RIBANI et al., 2004). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry - Iupac*) também concebeu um documento técnico de orientação estabelecendo diretrizes para a validação de métodos analíticos, com o título *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*, sendo este documento adotado pela ISO (*International Standardization Organization*) (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002). O *Laboratory of*

Government Chemist (LGC), no Reino Unido, desenvolveu um guia para validação de métodos interna, incluindo discussões relacionadas à acreditação laboratorial. A *United States Food and Drugs Administration* (US-FDA) desenvolveu dois guias para a indústria, um para validação de métodos analíticos e outro para validação de métodos bioanalíticos (HUBER, 2010).

A validação de métodos analíticos pode ser classificada em duas formas gerais quanto à amplitude do processo de validação executado: a *in-house validation*, sendo esta entendida como uma validação interna de um método em laboratório específico; e a *full validation*, uma validação mais ampla ou completa, executada por diversos laboratórios por meio de ensaios interlaboratoriais, com o objetivo de avaliar o desempenho ou comportamento do método em laboratórios diferentes (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). De acordo com o que estabelece a norma ISO/IEC 17025, que define os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração, devem ser validados métodos não normalizados, métodos desenvolvidos/criados pelo próprio laboratório, métodos normalizados, métodos usados fora dos escopos de aplicação e métodos normalizados modificados, visando a garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisão (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005a).

A validação de métodos na cromatografia gasosa

As técnicas de cromatografia analítica (cromatografia em coluna), dividindo-se entre as diferentes modalidades de cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são técnicas, há tempos, reconhecidamente poderosas na execução de análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, alimentícias, farmacêuticas, biológicas, entre outras. Nesse sentido, apesar de os métodos e instrumentações empregados em cromatografia serem analiticamente poderosos, com colunas ca-

pilares com elevada capacidade de separação e detectores com alta sensibilidade, ainda assim, a execução da validação de um método cromatográfico é indispensável.

Não obstante a sofisticação dos equipamentos modernos, vários fatores, como a natureza e complexidade da amostra, a natureza química dos analitos, condições de infraestrutura e operação do laboratório, fatores humanos, como o nível de treinamento dos analistas na técnica, entre outros, podem afetar drasticamente a execução de um método analítico, comprometendo de maneira igualmente drástica os resultados da análise cromatográfica e invalidando toda e qualquer tomada de decisão.

Com base nas questões citadas acima, os profissionais que atuam na área de análise química utilizando técnicas cromatográficas (e outras técnicas também), devem, antes da utilização dos métodos analíticos em suas atividades laboratoriais, promover a validação desses métodos, a fim de determinar em quais condições cromatográficas e de procedimento pode-se desenvolver um método com desempenho mais elevado para a determinação do(s) analito(s) na amostra, usufruindo de forma coerente do poder analítico da técnica cromatográfica. Nas próximas seções do capítulo, entenderemos como a validação de um método deve ser executada, denotando caminhos específicos que devem ser traçados para a validação de um método em cromatografia gasosa.

O processo de validação

Em um processo ou estudo de validação de um procedimento analítico, deve-se planejar, desenvolver e executar uma série de ensaios em laboratório, utilizando padrões e amostras com matrizes idênticas ou similares às matrizes das amostras reais que serão analisadas rotineiramente (BRASIL, 2011). Para o planejamento e execução dos ensaios de validação, é necessário classificar o método analítico dentro de uma determinada categoria ou classe, que está relacionada com a aplicação pretendida para esse método. Resumi-

damente, a abordagem relacionada aos ensaios e parâmetros de desempenho que devem ser avaliados para um método analítico, que tem como escopo de aplicação a determinação de traços do analito na amostra, é diferente da que se faz para um método aplicado à determinação de componentes principais. Ou seja, para cada tipo de aplicação de um método haverá um tipo de estudo de validação mais adequado (EURACHEM, 1998; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Veremos adiante quais critérios devem ser considerados na definição do escopo de aplicação dos métodos analíticos.

Quando e como validar um método analítico

Como vimos nas seções anteriores, um método analítico deve ser validado quando é necessário verificar se os seus parâmetros de desempenho são adequados para o uso em um problema analítico particular. Exemplos:

- novo método desenvolvido para um problema particular;
- método já estabelecido, mas revisto para incorporar melhorias ou ser estendido a um novo problema;
- quando o controle de qualidade (CQ) indica que um método já estabelecido está sofrendo variações com o tempo;
- método estabelecido usado em um laboratório diferente ou por diferentes analistas ou em instrumentos diferentes;
- para mostrar equivalência entre dois métodos diferentes, por exemplo, na comparação de um método padrão e um novo método desenvolvido.

A extensão requerida da validação ou revalidação do método dependerá da natureza das alterações efetuadas quando da sua replicação em diferentes laboratórios, com diferentes instrumentações e operadores e das circunstâncias nas quais o método será usado (EURACHEM, 1998). No planejamento e execução da validação,

objetivamente, é sugerida a seguinte sequência de ações (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011; BRASIL, 2011):

- definir a aplicação e escopo do método;
- definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- verificar se as características do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- qualificar os materiais empregados no estudo, por exemplo, padrões e reagentes;
- planejar os experimentos de validação, incluindo tratamento estatístico;
- executar os experimentos;
- elaborar procedimento operacional padrão (POP) para a execução do procedimento analítico validado;
- relatório final da validação e documentação.

Os parâmetros analíticos tradicionalmente recomendados pelos guias, normas ou resoluções publicadas pelos órgãos reguladores e instituições competentes na área de metrologia química são (EURACHEM, 1998; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011):

- Seletividade/efeito matriz
- Linearidade
- Faixa de trabalho e faixa linear
- Limite de detecção (l_d)
- Limite de quantificação (l_q)
- Precisão
- Exatidão
- Robustez
- Incerteza da medição

Esses são os parâmetros de validação, sendo interpretados como características de desempenho analítico do método. Mais adiante, esses parâmetros são avaliados com a devida profundidade, sendo contextualizados no âmbito dos métodos de cromatografia gasosa.

Quem realiza a validação do método

O laboratório, no uso de um método, deve garantir que este método está adequadamente validado, e, se necessário, conduzir a realização de novas atividades para obter dados suplementares aos já existentes. Podemos considerar como exemplo um método que já tenha sido validado por uma organização de padronização, como a ISO (*International Standardization Organization*) ou a AOAC *International*. Nessa situação, o usuário do método deverá, normalmente, apenas estabelecer os dados de desempenho necessários à sua aplicação.

Se um método analítico está sendo desenvolvido para ser aplicado numa ampla faixa de uso, possivelmente para ser publicado como procedimento padrão, então, estudos interlaboratoriais envolvendo um conjunto de laboratórios é o caminho mais conveniente para promover a validação, sendo esse o tipo de validação denominado validação completa (*full validation*).

Quando um laboratório trabalha de maneira isolada, o volume de dados de validação é mais reduzido, não havendo, principalmente, as informações relacionadas à comparabilidade interlaboratorial do método. Contudo, é preciso ter em mente que essas informações não são sempre requeridas, de maneira que, dependendo do contexto, a falta deles não será um problema. Uma maneira viável de se obter alguma ideia sobre a comparabilidade dos resultados da medição, obtidos com o método validado no laboratório, é a análise de materiais de referência certificados (MRC) utilizando o método ou comparando com um método padrão já validado (EURACHEM, 1998).

Definindo a aplicação e escopo do método

De uma maneira geral, as metodologias analíticas podem ser classificadas, quanto ao tipo de aplicação, nas principais classes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RAVICHANDRAN et al., 2010; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011; BRASIL, 2011):

- I. Ensaio de identificação (método qualitativo);
- II. Ensaios para identificação e quantificação de componente principal;
- III. Ensaios de identificação e quantificação de componentes em concentrações traço;
- IV. Ensaios de identificação e quantificação para determinação de impurezas e produtos de degradação em matérias-primas ou produtos e ensaios-limite.

A Tabela 6.1 a seguir mostra quais parâmetros de validação recomenda-se que sejam determinados, levando em consideração o tipo de aplicação pretendida para o método analítico a ser validado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; BRASIL, 2011; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011).

Os ensaios de identificação, também denominados de ensaios qualitativos, são executados quando se deseja garantir ou determinar a identidade de uma espécie química na amostra. Esses métodos analíticos fundamentam-se na comparação de uma propriedade da amostra, como, por exemplo, um espectro ou cromatograma, com propriedades de um padrão de referência da espécie química em análise (RAVICHANDRAN et al., 2010).

Tabela 6.1 - Classes de ensaios e parâmetros de validação a serem determinados

| Classe do método analítico quanto à aplicação | | | | | |
|--|------------------------|---|--|---|---------------------------------------|
| Parâmetro de validação | Ensaio qualitativo (I) | Determinação de componente principal (II) | Ensaio nível de concentração traço (III) | Determinação de impurezas e produtos de degradação (IV) | Ensaio-limite (semiquantitativo) (IV) |
| Seletividade | + | + | + | + | + |
| Linearidade/faixa de trabalho | - | + | + | + | -* |
| Limite de detecção (LD) | + | -* | + | + | + |
| Limite de quantificação (LQ) | - | -* | + | + | - |
| Precisão | - | + | + | +** | -* |
| Exatidão | - | + | + | + | -* |
| Robustez | + | + | + | + | + |
| Incerteza de medição | - | + | + | + | -* |

Fonte: Elaborada pelo autor a partir de dados disponíveis em: <<https://goo.gl/sSW7zt>>.

+ = o parâmetro deve ser determinado no processo de validação; - = o parâmetro não necessita ser determinado no processo de validação; * = o parâmetro deve ser determinado dependendo da aplicação específica; ** = se houver comprovação da reprodutibilidade, a precisão intermediária não necessita ser determinada.

Os constituintes determinados em procedimentos analíticos podem abranger uma ampla faixa de concentração. Os ensaios para determinação de componentes principais são métodos analíticos que visam a identificar e quantificar um ou mais constituintes majoritários em uma amostra. Pode ser considerado constituinte majoritário ou componente principal toda espécie química presente na amostra na faixa de peso relativo de 1% a 100%. Apesar de, na maioria das aplicações de métodos de determinação de componentes principais, não haver a necessidade técnica da determinação dos parâmetros limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), em alguns con-

textos analíticos específicos, poderá ser recomendada e requerida a determinação desses parâmetros (SKOOG et al., 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011).

Os ensaios para determinação de impurezas e produtos de degradação podem ser interpretados como métodos analíticos quantitativos que visam à determinação de constituintes minoritários na amostra. Nessa modalidade de métodos analíticos, as concentrações das espécies químicas encontram-se na faixa de peso relativo de 0,01% a 1% (SKOOG et al., 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011). Os ensaios-limite são modalidades de métodos analíticos quantitativos ou semiquantitativos aplicados na determinação de impurezas presentes em amostras ou produtos, visando apenas a avaliar se essas espécies químicas encontram-se em níveis de concentração acima de limites estabelecidos por órgãos reguladores. Como vimos na Tabela 6.1, os ensaios-limite semiquantitativos requerem apenas a determinação dos parâmetros seletividade, limite de detecção (LD) e robustez. Em situações de ensaios-limite quantitativos, há necessidade da determinação adicional dos parâmetros linearidade/faixa linear, precisão, exatidão e incerteza da medição (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; BRASIL, 2011).

Os ensaios para determinação de espécies químicas em nível de concentração traço (*análise de traços*) são métodos analíticos que visam a identificar e quantificar espécies em concentrações tradicionalmente na faixa de 1ppb (1µg/kg) a 100ppm (100mg/kg) na amostra (SKOOG et al., 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE, E TECNOLOGIA, 2011). No desenvolvimento de métodos analíticos altamente sensíveis, como, por exemplo, para a identificação e quantificação de espécies químicas alvo em concentrações abaixo de 1ppb, classificam-se esses métodos como métodos analíticos “ultra traço” (SKOOG et al., 2005). Os parâmetros de validação requeridos para essa modalidade de método são similares aos requeridos para a determinação de traços.

Vimos, então, que, uma vez definida a aplicação e o escopo do método analítico, podemos definir quais parâmetros de desempenho do método devem ser englobados pelo estudo de validação, de maneira que os desenvolvedores e usuários do método devem ter em mente que a requisição de parâmetros de validação específicos para cada modalidade de aplicação possui uma razão de ser técnica e não meramente convencional. Com o entendimento dos conceitos e definições de cada parâmetro de validação, você poderá compreender criticamente, do ponto de vista analítico, porque determinados parâmetros de desempenho são requeridos para determinados tipos de métodos analíticos.

Uma estratégia útil para determinar com clareza o escopo e aplicação de um método analítico e, por consequência, definir de forma coerente quais os critérios de aceitação e quais parâmetros de validação devem ser determinados é especificar de maneira objetiva as seguintes características do método (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009):

- Qual(quais) espécie(s) química(s) será(serão) determinada(s) (analito).
- Nível de concentração esperada do analito na amostra.
- Faixa de concentração de interesse.
- Natureza da amostra, tipo de matriz e sua composição geral.
- Prováveis interferentes.
- Existência de regras ou normas estabelecidas por órgãos hierarquicamente superiores e requisitos para o método examinado.
- Tipo de informação esperada (análise quantitativa ou qualitativa).
- Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) requeridos.
- Precisão e exatidão requeridas.
- Robustez requerida para o método.
- Instrumentos requeridos: se as determinações dependem de um dado método que deve ser conduzido empregando instrumentos de medida estritamente definidos ou similares.

O desenvolvimento do método

O desenvolvimento de um método analítico pode ser conduzido de diversas maneiras. Existem situações nas quais o método analítico para a determinação de espécies alvo no tipo de amostra de trabalho do laboratório já está bem estabelecido, publicado em manuais, guias ou normas concebidas por órgãos reguladores ou outras instituições competentes, havendo a necessidade apenas de validação interna do método no laboratório (*in-house validation*). Porém, há inúmeras situações, principalmente no âmbito da pesquisa acadêmica, em que há a necessidade de adaptação de métodos já estabelecidos para determinados escopos para uso em outras aplicações, sendo realizadas pequenas mudanças no procedimento original a fim de adequá-lo ao escopo de interesse da pesquisa. Também há casos em que a única saída é o desenvolvimento de métodos novos, o que torna o trabalho um tanto quanto mais complexo.

Por exemplo, considere um método analítico estabelecido para a determinação quantitativa de tolueno em águas naturais. Esse método pode ser razoavelmente adaptado para a determinação de benzeno em águas naturais. Veja que a matriz é a mesma, e os compostos em questão possuem propriedades químicas significativamente similares.

Figura 6.1 - Estruturas moleculares dos hidrocarbonetos aromáticos tolueno (C_7H_8) e benzeno (C_6H_6)



Fonte: Elaborada pelos autores.

No caso acima, os princípios aplicados nos processos de isolamento, identificação e quantificação definidos no método para a determinação de tolueno podem ser convenientemente adaptados ao benzeno. Se, por outro lado, houver a necessidade de determinar benzeno em solo, o método desenvolvido para a determinação em águas naturais pode não ser uma opção viável para adaptação, tendo em vista a significativa diferença entre as matrizes da água e do solo (EURACHEM, 1998).

Finalmente, o pesquisador pode partir de um determinado esboço de ideias, conhecimentos teóricos e práticos e concentrar esforços no desenvolvimento de um método novo e mais adequado para a aplicação pretendida. Isso envolverá significativa inovação baseada na investigação das propriedades do analito e da matriz. O desenvolvimento de métodos novos demanda uma carga de trabalho mais intensa, havendo um apreciável grau de dúvida sobre a eficiência do método final desenvolvido (EURACHEM, 1998). Esse é o caminho mais complexo e árduo, porém paradoxalmente prazeroso e bastante recompensador, do ponto de vista de evolução como químico analítico ou como profissional de áreas afins que utilizam métodos analíticos em suas atividades.

Parâmetros de validação de um método

Os parâmetros de validação são características de desempenho (*performance*) de um método analítico. Uma vez que essas características são determinadas ou estimadas experimentalmente, podemos conhecer qual a eficiência do método com relação a diferentes atributos químicos, analíticos e metrológicos e comprovar a sua eficácia para a aplicação pretendida.

Como relatado na seção anterior, os parâmetros que devem ser tradicionalmente determinados nos estudos de validação são: *seletividade*, *linearidade*, *faixa linear e faixa de trabalho*, *limite de detecção*, *limite de quantificação*, *precisão*, *exatidão*, *robustez e incerteza de medição*. Na condução dos experimentos do processo de valida-

ção, há uma sequência lógica na qual os parâmetros de desempenho devem ser determinados, seguindo a ordem de ações abaixo:

1. Determinar a seletividade (se a seletividade não for assegurada, os parâmetros linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidos);
2. Determinar a linearidade, faixa de trabalho e faixa linear;
3. Determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ);
4. Determinar a precisão (estudos da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade);
5. Determinar a exatidão (estudos com materiais de referência certificados ou ensaios de recuperação);
6. Determinar a robustez;
7. Estimativa da incerteza de medição.

A execução dos experimentos de validação requer o uso de uma série de ferramentas necessárias para a determinação e estimativa dos parâmetros de desempenho, sendo elas:

- branco da amostra (incluindo o denominado branco dos reagentes);
- soluções padrão (padrões analíticos e de calibração e amostras teste);
- amostras com quantidade conhecidas do analito (amostras fortificadas *spiked*);
- materiais de referência certificados (MRCs);
- réplicas dos ensaios;
- processamento estatístico dos resultados.

Seletividade

A seletividade de um método analítico é definida como sendo a capacidade desse método em quantificar de modo exato (*fielmente*) a espécie química de interesse na amostra analítica (*matriz*), na presença de poten-

ciais interferentes. Portanto, a determinação da seletividade de um método reflete o seu poder ou desempenho em fornecer uma resposta analítica, para o componente alvo, livre de interferências de espécies que possuam propriedades químicas análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, entre outras). Em algumas fontes da literatura sobre validação, ainda podemos encontrar o termo *especificidade* como possuindo significado semelhante ao de seletividade. Porém, como essa questão tem gerado frequentes confusões entre os profissionais, sugere-se o uso apenas do termo *seletividade*, conforme recomendação da Iupac (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BRASIL, 2011).

Os interferentes oriundos da matriz podem atenuar ou ampliar o sinal analítico relativo à espécie de interesse, sendo a magnitude desse efeito intimamente ligada ao nível de concentração do analito na amostra (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011). A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser determinado no desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada rotineiramente durante a validação e posterior uso do método. Durante o estudo de validação, podem ocorrer processos de degradação de compostos presentes na matriz da amostra (*reações químicas adversas*), havendo a produção de outras espécies que podem vir a interferir na determinação do analito (RIBANI et al., 2004).

Procedimentos para determinação da seletividade

A seletividade pode ser demonstrada de diversas maneiras. O modo de sua determinação deve ser escolhido com base no objetivo da análise. De forma geral, a seletividade do método de análise pode ser avaliada pela comparação entre os sinais (resposta instrumental) do analito de interesse na amostra processada e em solvente puro (aquoso ou orgânico) (BRASIL, 2011).

(a) Métodos de análise qualitativa

Para análise qualitativa (ensaios de identificação), é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre espécies com propriedades químicas similares que podem estar presentes na amostra. Isso deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito (preferencialmente materiais de referência certificados), comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contêm o analito, mas sim espécies com propriedades semelhantes.

(b) Métodos de análise quantitativa

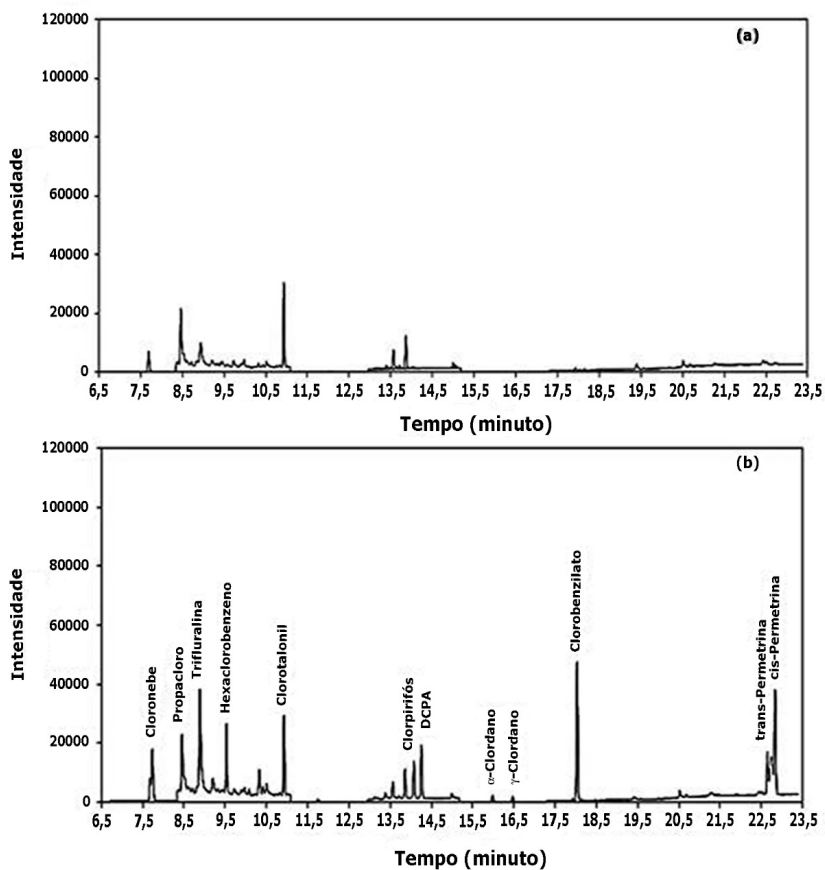
Para análise quantitativa, a seletividade pode ser demonstrada por meio da comparação de resultados obtidos de amostras isentas do analito de interesse e amostras fortificadas (*spiked*) com o analito, de modo a avaliar se os resultados são afetados pelas espécies concomitantes presentes na amostra. Em procedimentos cromatográficos, deve-se garantir as condições necessárias para a obtenção de resoluções de pico adequadas. Em métodos de cromatografia gasosa que empregam a detecção por espectrometria de massas (CG-EM), a seletividade pode ser demonstrada pela avaliação da “pureza” do pico cromatográfico (sinal analítico) relativo ao(s) composto(s) de interesse utilizando-se a ferramenta disponível nesse tipo de detector (ver capítulo sobre detectores).

Quando não é possível a obtenção de amostras isentas do analito, um caminho possível para a avaliação da seletividade é a aplicação do método de calibração por adição de padrão.

Na Figura 6.2, temos um exemplo de cromatogramas obtidos num estudo de seletividade durante a validação de um método para a determinação de 12 pesticidas clorados de diferentes grupos químicos em frutos de manga, via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Na Figura

6.2a, temos o cromatograma obtido da injeção da amostra isenta dos pesticidas alvo, ou seja, o cromatograma do branco da amostra. Na Figura 6.2b, temos o cromatograma obtido da injeção da amostra fortificada em 1mg/Kg para todos os pesticidas.

Figura 6.2 - Cromatogramas CG/EM, modo SIM de monitoramento. (a) Cromatograma do extrato de manga orgânica isenta dos analitos; (b) cromatograma do extrato fortificado com os 12 pesticidas alvo: cloronebe; propacloro; trifluralina; hexaclorobenzeno; clorotalonil; clorpirifós; DCPA; α -clordano; γ -clordano; clorobenzilato; trans-permetrina e cis-permetrina



Fonte: Elaborada pelos autores.

Nessa situação, o analista deve avaliar comparativamente os cromatogramas da amostra em branco e da amostra fortificada, atentando para a presença de picos cromatográficos associados a compostos coextrativos da amostra, em tempos de retenção próximos ou similares aos tempos de retenção dos analitos. A inspeção visual dos cromatogramas nos mostra que alguns compostos oriundos da matriz eluem em tempos de retenção muito próximos aos de determinados pesticidas, como é o caso de cloronebe, propacloro e clorotalonil.

Dessa observação experimental, vemos que, sob as condições de corrida cromatográfica e detecção definidas para o método, este não apresenta seletividade satisfatória para os pesticidas citados acima.

Efeito matriz

A complexidade da amostra e a elevada diversidade de compostos que a constitui pode gerar problemas críticos na quantificação da(s) espécie(s) alvo. O efeito matriz é resultado da interferência de coextrativos da amostra que afetam a seletividade do método e, conseqüentemente, a precisão e exatidão dos resultados da análise (PICÓ; BLASCO; FONT, 2003; PINHO et al., 2009). O estudo do efeito matriz, dentro do contexto da seletividade, visa a investigar possíveis interferências promovidas pelas diversas substâncias que constituem a matriz amostral de maneira mais profunda.

O estudo de efeito matriz é imprescindível quando os analistas desejam trabalhar com curvas de calibração construídas por padronização externa (padrões analíticos de calibração em solvente puro), ou seja, uma curva de calibração não “matrizada” (BRASIL, 2011).

Procedimento de determinação do efeito matriz:

- I. Preparar uma curva de calibração do(s) analito(s) em solvente puro (padronização externa), com no mínimo 5 níveis (p) de concentração ($p \geq 5$).
- II. Analisar amostras preparadas, no mínimo, em 3 níveis de concentração (*fortificação*), de maneira que o limite

permitido ou concentração esperada para o(s) analito(s) se encontre, preferencialmente, na região central dos níveis de fortificação. Devem ser analisadas no mínimo 6 réplicas (i) da amostra em cada nível de fortificação ($i \geq 6$) (BRASIL, 2011):

- analisar mínimo de 6 réplicas de amostra em solvente puro (amostra não matrizada) nos 3 níveis de fortificação;
- analisar mínimo de 6 réplicas da amostra em branco (extrato da amostra inicialmente isenta do analito) fortificadas com o analito nos 3 níveis de fortificação estabelecidos.

III. Após as análises das amostras replicadas com analito em solvente puro e analito na matriz da amostra, proceder à quantificação empregando a equação da curva de calibração preparada por padronização externa. A avaliação dos resultados deve ser conduzida conforme descrito a seguir.

Avaliação e critérios de aceitação do efeito matriz

Com os resultados dos experimentos das réplicas de amostra do analito em solvente puro e das amostras de extrato da matriz em branco, fortificadas com o(s) analito(s), deve-se aplicar avaliação estatística pelo teste F (Fisher-Snedecor), para avaliar a homogeneidade das variâncias. Esse teste possibilita verificar se as variâncias das concentrações quantificadas nas amostras *não matrizadas* (em solvente puro) e as variâncias das concentrações das amostras *matrizadas* podem ser consideradas estatisticamente iguais em cada nível de concentração (*fortificação*) i , com um dado nível de confiança (BRASIL, 2011).

O teste estatístico deve ser conduzido aplicando-se a Equação 6.1:

$$F = \frac{S_{i,1}^2}{S_{i,2}^2} \quad (\text{Eq. 6.1})$$

Em que:

$s^2_{i,1}$ e $s^2_{i,2}$ = variâncias da concentração do analito num dado nível de fortificação i nas amostras em solvente puro (não matrizadas) e nos extratos das amostras fortificados (amostras matrizadas).

Observação: A maior variância deve ser inserida no numerador da equação para o cálculo do parâmetro F .

Uma vez calculado o valor do parâmetro F_{calc} (F calculado), devemos comparar o seu valor com o valor de F tabelado, definindo o valor de $F_{crit, \alpha, v}$ (F crítico) para um dado nível de significância (α) ou nível de confiança ($1-\alpha$) e graus de liberdade dos grupos de amostra v_1 e v_2 (SKOOG et al., 2005; BRASIL, 2011). Por exemplo:

Considerando que os grupos de amostra foram analisados em 6 réplicas ($N=6$), teremos $v = (N - 1) = 5$ graus de liberdade no numerador e 5 graus de liberdade no denominador. Geralmente, recomenda-se a escolha do nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) ou nível de confiança $(1-\alpha) = 0,95$ (95%).

Para finalizar o teste, devemos considerar a seguinte interpretação:

- Se o valor de $F_{calc,i}$ para um dado nível de concentração i for menor que $F_{crit, \alpha, v}$ ($F_{calc,i} < F_{crit, \alpha, v}$), as variâncias para esse nível de concentração podem ser consideradas estatisticamente iguais. Do ponto de vista do método analítico, podemos, então, considerar que o efeito matriz não tem efeito significativo sobre a precisão dos resultados no nível de concentração i , para o nível de confiança selecionado.
- Se $F_{calc,i} > F_{crit, \alpha, v}$, as variâncias não são consideradas estatisticamente iguais, de maneira que podemos concluir, com um dado nível de confiança, que a matriz afeta a precisão dos resultados de concentração do analito obtidos com o método.

No caso de os constituintes da matriz não terem efeito sobre a precisão dos resultados de concentração obtidos com o procedimento analítico, os desvios padrão (s) dos dois grupos de análise podem ser agrupados para obtenção do desvio padrão combinado (S_{comb}) e posterior execução do teste t de Student. Esse teste possibilita a avaliação da igualdade estatística das médias das concentrações x_1 e x_2 obtidas para as amostras do analito em solvente puro (amostras não matrizadas) e nas amostras matrizadas, em cada nível de concentração i (BRASIL, 2011).

O teste t para comparação das médias das concentrações deve ser conduzido pelos seguintes cálculos:

- I. Calcular as médias das concentrações determinadas para as réplicas das amostras com analito em solvente puro e para as réplicas com analito na matriz (extrato da amostra fortificado) x_1 e x_2 ;
- II. Calcular os desvios padrão $S_{i,1}$ e $S_{i,2}$ das concentrações do analito no i -ésimo nível de fortificação;
- III. Calcular o valor do parâmetro $t_{calc,i}$ para teste de comparação das médias das concentrações, conforme equação abaixo:

$$t_{cal} = \frac{|x_{i,1} - x_{i,2}|}{\sqrt{S_{comb}^2 \left(\frac{1}{N_{i,1}} + \frac{1}{N_{i,2}} \right)}} \quad (\text{Eq. 6.2})$$

Para o caso específico do estudo de efeito matriz considerado, o desvio padrão combinado pode ser calculado pela Equação 6.3:

$$S_{comb}^2 = \frac{(N_{i,1} - 1) * S_{i,1}^2 + (N_{i,2} - 1) * S_{i,2}^2}{(N_{i,1} + N_{i,2} - 2)} \quad (\text{Eq. 6.3})$$

Em que:

$N_{i,1}$ e $N_{i,2}$ correspondem ao número de réplicas analisadas em cada grupo de amostras (analito em solvente puro e analito em amostra matrizada) no nível de concentração i (BRASIL, 2011).

Para finalizar o teste, devemos considerar a seguinte interpretação:

- Se o valor de $t_{calc,i}$ para um dado nível de concentração i , for menor que $t_{crit,a,v}$ ($t_{calc,i} < t_{crit,a,v}$), tabelado para $(N_{i,1} + N_{i,2} - 2)$ graus de liberdade e um dado nível de significância (α) ou confiança $(1-\alpha)$, pode-se concluir que os constituintes da matriz da amostra não afetam a determinação do analito pelo método considerado.
- Se ($t_{calc,i} > t_{crit,a,v}$), para os graus de liberdade (v) e nível de significância (α)/confiança $(1-\alpha)$ considerados, pode-se concluir que os constituintes da matriz possuem efeito significativo sobre a determinação da concentração do analito pelo método considerado.

Se, em um dado nível de concentração i do estudo do efeito matriz, concluir-se que as variâncias dos dois grupos de amostra (não matrizadas e matrizadas) forem estatisticamente diferentes, conforme mostrado anteriormente ($F_{calc,i} > F_{crit, a, v}$), o efeito matriz deve ser avaliado pelo teste t de Student, por meio da Equação 6.4:

$$t_{cat} = \frac{|x_{i,1} - x_{i,2}|}{\sqrt{\frac{S_{i,1}^2}{N_{i,1}} + \frac{S_{i,2}^2}{N_{i,2}}}} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

Nessa situação, o cálculo do número de graus de liberdade (v) para um dado nível de concentração i , para que se possa determinar o valor do parâmetro $t_{crit,a,v}$ tabelado, deve ser feito pela Equação 6.5:

$$v = \frac{\left(\frac{S_{i,1}^2}{N_{i,1}} + \frac{S_{i,2}^2}{N_{i,2}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_{i,1}^2}{N_{i,1}}\right)^2}{N_{i,1} + 1} + \frac{\left(\frac{S_{i,2}^2}{N_{i,2}}\right)^2}{N_{i,2} + 1}} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

A interpretação final do teste t , nesse caso, é análoga à descrita anteriormente, ou seja:

- Se o $t_{calc,i} \leq t_{crit,a,v}$, não há efeito significativo da matriz sobre a determinação do analito pelo método;
- Se o $t_{calc,i} \geq t_{crit,a,v}$, há efeito significativo da matriz sobre a determinação do analito pelo método.

Finalmente, como critério de aceitação, não deve haver efeito matriz em nenhum dos níveis de concentração/fortificação i definidos no estudo (BRASIL, 2011).

Procedimento alternativo para a determinação do efeito matriz

Uma forma mais simples para se avaliar o efeito matriz no desenvolvimento e validação de um método baseia-se na comparação estatística das inclinações e interceptos de um par de curvas de calibração. O procedimento pode ser executado como descrito a seguir (BRASIL, 2011):

Inicialmente, deve ser construída uma curva de calibração empregando padrões do analito em solvente puro (*calibração por padronização externa*) e uma curva empregando padrões de calibração preparados na própria matriz, ou seja, em extratos em

branco da amostra fortificados para dar as concentrações desejadas para a curva de calibração (*calibração por superposição da matriz*).

Ambas as curvas de calibração devem ser preparadas com, no mínimo, 5 níveis de concentração ($p \geq 5$), de maneira que as soluções padrão de calibração devem ser preparadas e analisadas no mínimo em triplicata ($N_i \geq 3$; $N_y \geq 30$). Após a construção das curvas, sob as condições do método, e a obtenção das equações de regressão, deve-se aplicar o teste F (Fisher-Snedecor) para avaliar a igualdade estatística das variâncias dos parâmetros das curvas a e b (s_1^2 e s_2^2). Se o valor de $F_{calc,i}$ for menor que $F_{crit, \alpha, \nu}$ ($F_{calc,i} < F_{crit, \alpha, \nu}$), as variâncias dos interceptos podem ser consideradas estatisticamente iguais (conforme descrito no procedimento anterior).

Em seguida, deve-se aplicar o teste t de Student para avaliar a igualdade estatística dos interceptos b_1 e b_2 e as inclinações a_1 e a_2 de ambas as curvas. O parâmetro t_{calc} deve ser calculado para as inclinações e interceptos, respectivamente, conforme Equações 6.6 e 6.7:

$$t_{cal} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a,p}^2 \left(\frac{1}{N_{x,1}} + \frac{1}{N_{x,2}} \right)}} \quad (\text{Eq. 6.6})$$

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b,p}^2 \left(\frac{1}{N_{x,1}} + \frac{1}{N_{x,2}} \right)}} \quad (\text{Eq. 6.7})$$

O cálculo de $S_{a,p}^2$ e $S_{b,p}^2$ deve ser feito de maneira análoga ao cálculo de S_{comb}^2 , conforme Equações 6.8 e 6.9:

$$S_{a,p}^2 = \frac{(N_{x,1} - 1) * S_{a1}^2 + (N_{x,2} - 1) * S_{a2}^2}{(N_{x,1} + N_{x,2} - 2)} \quad (\text{Eq. 6.8})$$

$$S_{b,p}^2 = \frac{(N_{x,1} - 1) * S_{b1}^2 + (N_{x,2} - 1) * S_{b2}^2}{(N_{x,1} + N_{x,2} - 2)} \quad (\text{Eq. 6.9})$$

- Se $t_{calc} \leq t_{crit,a,v}$, não há efeito significativo da matriz sobre a determinação do analito pelo método;
- Se $t_{calc} \geq t_{crit,a,v}$, há efeito significativo da matriz sobre a determinação do analito pelo método.

Avaliação do efeito matriz via método da adição de padrão

Em situações nas quais não seja possível para o laboratório obter uma amostra isenta do(s) analito(s) para o preparo de extratos da matriz em branco, usados nos ensaios de fortificação, a única saída é a aplicação de estudos empregando o método de calibração por adição de padrão.

- I. Construir uma curva analítica com os padrões de calibração, produzidos na própria amostra, pela adição de quantidades crescentes de um padrão do analito;
- II. Construir uma curva analítica por padronização externa (padrões de calibração em solvente puro);
- III. Comparar estatisticamente, por meio do teste t de Student, as concentrações médias do analito estimadas em réplicas da amostra aplicando os diferentes métodos de calibração.

Linearidade/faixa de trabalho

Os parâmetros de desempenho linearidade e faixa de trabalho são características do método relacionadas à etapa de calibração. A linearidade é a capacidade do método analítico em fornecer uma relação

diretamente proporcional (*linear*) entre o sinal analítico de saída do instrumento e a concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa/intervalo de concentração especificada, denominada faixa de trabalho. A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Quando possível, o valor de concentração esperado para a amostra deve estar localizado na região central da curva de calibração (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RAVICHANDRAN et al., 2010; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011; BRASIL, 2011).

A linearidade pode ser obtida por meio de padronização externa ou interna, formulando-se uma expressão matemática aplicada à estimativa da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Para a avaliação da linearidade, podemos fazer a inspeção dos gráficos obtidos dos ensaios de medida do sinal analítico em função da concentração, verificando-se a equação de regressão linear, estimada pelo método dos mínimos quadrados (MMQ). Deve ser avaliada, previamente, a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração da calibração e a homocedasticidade dos dados (*homogeneidade da variância dos resíduos*), para que, só então, seja conduzida a regressão linear (DANZER; CURRIER, 1998; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011). Abaixo, temos a representação genérica de uma equação de curva de calibração linear (Equação 6.10).

$$y = ax + b \quad (\text{Eq. 6.10})$$

Em que:

y = sinal analítico (altura ou área do pico cromatográfico etc.);

x = concentração do analito;

a = inclinação (coeficiente angular);

b = intercepto (coeficiente linear).

Historicamente, nos estudos de linearidade, o coeficiente de correlação R é um parâmetro interpretado como uma medida do grau de linearidade da calibração, de maneira que, quanto mais o valor de R aproxima-se de 1, mais considera-se que a equação de regressão é um modelo matemático adequado para a estimativa da concentração do analito na amostra (RAVICHANDRAN et al., 2010; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011). Em alguns casos, o coeficiente de determinação ou correlação múltipla R^2 , que é definido como “variação percentual explicada pelo modelo”, o qual, de acordo com a fundamentação estatística, pode variar no intervalo $0 \leq R^2 \leq 1$, também é aplicado como parâmetro para avaliar o grau de linearidade, de maneira análoga ao coeficiente de correlação R . Comumente, considera-se que quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever as variações em y (*eixo do sinal analítico*), tornando-o mais adequado à estimativa da concentração do analito. Porém, essa interpretação de R e R^2 como parâmetros de linearidade requer certa cautela (NETO; PIMENTEL, 1996).

Na realidade, os coeficientes de correlação e determinação R e R^2 , respectivamente, são uma medida da relação entre duas variáveis aleatórias (x,y) , não sendo um parâmetro tão seguro para definir o grau de linearidade (DANZER; CURRIER, 1998). Por exemplo, se considerarmos um valor de $R = 0,99$ ($R^2 = 0,98$), habitualmente, podemos encontrar interpretações que concluem que o ajuste de tal modelo de calibração é satisfatório, a julgar pelos valores altos de R e R^2 , mas devemos ter em mente que esse modelo descreve apenas 98% ($R^2 = 0,98$) da variação total em torno da média de y . Nesse caso, existe a possibilidade de que os 2% restantes das variações não explicadas pelo modelo estejam concentradas numa única porção da curva, o que indicaria falta de ajuste (NETO; PIMENTEL, 1996).

A linearidade de um modelo de calibração pode ser examinada adequadamente pela avaliação da distribuição dos resíduos ao longo dos valores de x , lembrando que os resíduos correspondem à diferença entre os valores obtidos experimentalmente para y_i (sinal analítico) e os valores previstos \hat{y}_i pela equação do modelo ($y_i - \hat{y}_i$). Uma

vez definida a homocedasticidade das variâncias, pode-se prosseguir com a estimativa da equação de calibração via método dos mínimos quadrados normais (MMQN), de maneira que, em caso de heterocedasticidade (variâncias não homogêneas), a equação de calibração deverá ser estimada via mínimos quadrados ponderados (MMQP), que é o método de regressão linear adequado para essa condição. Finalmente, a hipótese de linearidade ou ajuste do modelo pode ser testada estatisticamente pelo teste F para a falta de ajuste, para, só assim, obter-se a conclusão de linearidade com confiabilidade estatística (DANZER; CURRIER, 1998; MILLER; MILLER, 2005).

Procedimento para determinação da linearidade

Os estudos de linearidade devem ser conduzidos com um número p mínimo de, pelo menos, 5 soluções padrão de calibração ($p \geq 5$). As soluções padrão de cada nível p devem ser preparadas independentemente, no mínimo, 3 vezes ($j \geq 3$). Cada uma das soluções padrão de calibração deve ser injetada no cromatógrafo, no mínimo, 1 vez, de maneira que o número total de respostas analíticas N_y para as soluções padrão seja igual ou superior a 30 ($N_y \geq 30$) (BRASIL, 2011). As leituras das soluções padrão devem ser feitas aleatoriamente, e os ajustes das curvas de calibração *não* devem ser forçados a passar pela origem (0,0).

Teste da homocedasticidade

A homocedasticidade é uma característica da calibração que está relacionada com a homogeneidade das variâncias dos resíduos em cada nível de calibração. A condição de homocedasticidade é observada quando as variâncias dos resíduos $d_y = (y_i - \hat{y}_i)$ são constantes com relação aos valores de x (concentração), ou seja, com os níveis p da calibração. A distribuição dos resíduos ao longo dos valores de x pode ser verificada pelos gráficos de resíduos d_y em função de x (valores dos níveis de concentração p da calibração) (DANZER; CURRIER, 1998).

Como exemplo, podemos avaliar as situações na Figura 6.3a, em que os erros distribuem-se de forma aleatória, indicando o caráter homocedástico da calibração (*variâncias constantes dos resíduos*) e, portanto, a possibilidade de estimativa dos parâmetros de regressão via método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). A constatação de homocedasticidade também é um indicativo de ajuste do modelo linear para a curva de calibração (DANZER; CURRIER, 1998).

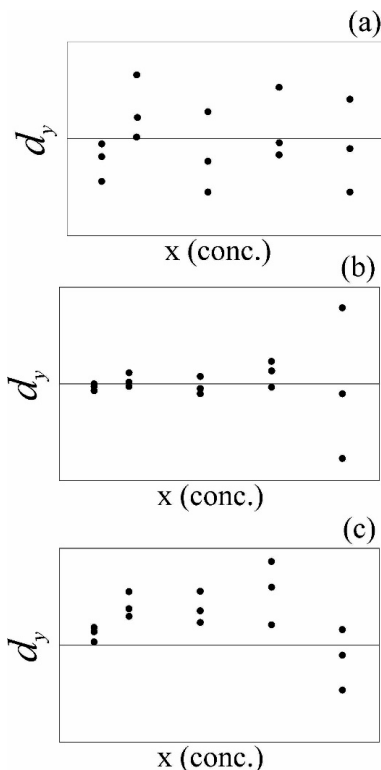
A Figura 6.3b mostra uma situação em que a variância dos resíduos não é constante, com gráfico possuindo, geralmente, um perfil afunilado. Nesses casos, a homocedasticidade pode ser verificada pelo teste de Hartley, que é baseado num teste F máximo, conduzido pela Equação 6.11 (DANZER; CURRIER, 1998; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009).

$$F_{calc} = \frac{S_{máx}^2}{S_{mín}^2} \quad (\text{Eq. 6.11})$$

Em que: $S_{máx}^2$ é a maior variância observada para os m_i valores obtidos para os p níveis de calibração, e $S_{mín}^2$, a menor variância observada. Os m_i valores devem ser iguais nos p níveis da calibração.

Na Figura 6.3c, podemos notar que os erros apresentam desvios sistemáticos, apresentando um perfil “em forma de U invertido”, indicando falta de ajuste do modelo linear.

Figura 6.3 - Gráficos típicos dos desvios residuais



Fonte: Elaborada pelos autores.

Existem duas situações diferentes que podem se apresentar na avaliação da hipótese de linearidade (DANZER; CURRIER, 1998):

Caso I: Teste *a priori* (sem levar em consideração nenhum modelo não linear)

Nesse tipo de caso, o analista/pesquisador, por experiência prévia, sabe que a relação entre a resposta analítica e a concentração é linear na faixa de concentração da calibração. Ou seja, ele já tem informações suficientes sobre o método e suas limitações. O ajuste do modelo linear para a calibração pode ser verificado pelo teste *F*, para comparar o desvio padrão residual $s_{y,x}$ (erro padrão da regressão) com o desvio padrão s_y dos

valores de y_{ij} (respostas analíticas para as réplicas de soluções padrão) em relação a suas médias y_i . O teste deve ser conduzido da seguinte maneira:

Calcular o valor do parâmetro F para a calibração pela equação:

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x}^2}{S_y^2} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^p m_i (y_i - y_i^*)^2}{(p-2)}}{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{m_i} (y_{ij} - y_i^*)^2}{(m-p)}} \quad (\text{Eq. 6.12})$$

Na equação, m_i corresponde ao número de medidas repetidas em cada nível p da calibração. Portanto:

$$\sum_{i=1}^p m_i = p * m_i = m \quad (\text{Eq. 6.13})$$

Em que: m corresponde ao número total de réplicas em todos os níveis p de calibração; y_i é a média dos valores obtidos para resposta analítica em cada nível p ; y_i^* , os valores previstos pelo modelo de calibração para a resposta analítica em cada nível de calibração; y_{ij} corresponde ao valor da resposta analítica obtida em cada réplica j de cada nível p de calibração.

Para finalizar o teste, devemos comparar o valor de F calculado (F_{calc}) com o valor de $F_{\alpha, \nu_1=(p-2)/ \nu_2=(m-p)}$ ($F_{critico}$) tabelado:

- Se $F_{calc} < F_{crit}$, a hipótese de linearidade é aceita, modelo linear ajustado;
- Se $F_{calc} > F_{crit}$, a hipótese de linearidade não deve ser admitida, o modelo linear não pode ser considerado ajustado.

Caso II: Teste *a posteriori* (em relação a um dado modelo não linear)

Nesse caso, o analista/pesquisador sabe que a relação entre a resposta analítica e a concentração tem grande chance de ser linear, mas não está absolutamente convicto disso. Para avaliar o ajuste do modelo, deve-se executar teste *F* comparando o desvio padrão residual do modelo linear com o desvio padrão residual do modelo não linear por meio da Equação 6.14:

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x,nlin}^2}{S_{y,x,lin}^2} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^p (y_i - y_i^*)^2}{(m-2)}}{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - y_i^*)^2}{v_{nlin}}} \quad (\text{Eq. 6.14})$$

O número de graus de liberdade para modelos lineares é $(m-2)$, se forem estimados dois parâmetros (inclinação e intercepto), e $(m-1)$, se for estimado apenas um parâmetro. No caso de modelos não lineares, o número de graus de liberdade v_{nlin} depende do modelo escolhido (número de parâmetros do modelo). Por exemplo, para uma equação quadrática $y = a + bx + cx^2$, $v_{nlin} = (m - 3)$, Mandel define que pode ser aplicado um teste apropriado para a equação quadrática, comparando-se:

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x,lin}^2 - S_{y,x,nlin}^2}{S_{y,x,lin}^2} \quad (\text{Eq. 6.15})$$

- Se $F_{calc} \leq F_{crit}$, a hipótese de linearidade é aceita, modelo linear adequado;
- Se $F_{calc} \geq F_{crit}$, a hipótese de linearidade não deve ser admitida, o modelo linear não pode ser aplicado.

Crêterios de aceita o da linearidade

Se os desvios padrão da repetitividade (s_y) da resposta instrumental em cada nível de concentra o da curva de calibra o não forem iguais, haverá, portanto, heterocedasticidade entre os dados da calibra o. A existência de heterocedasticidade gera a necessidade de se tratar os dados da calibra o pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP)(INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1998; BRASIL, 2011).

Teste de significância dos parâmetros da curva de calibra o

Idealmente, as linhas de regressão obtidas para as curvas de calibra o deveriam passar pela origem, ou seja, com o intercepto da curva passando pelo ponto (0,0) dos eixos cartesianos, obtendo-se uma calibra o idealizada. Para fins de avalia o da significância estatística dos parâmetros de regressão a e b dos modelos obtidos experimentalmente para as curvas de calibra o, torna-se útil compará-los com valores teoricamente esperados α e β para a curva de calibra o ideal, sendo $\alpha = 1$ e $\beta = 0$ (DANZER; CURRIER, 1998; LIGIERO et al., 2009).

O teste de significância dos parâmetros de calibra o   baseado num teste de hipótese aplicando o parâmetro t de Student para comparar os valores estimados para a inclina o (a) e o intercepto (b), com os valores referência $\alpha = 1$ e $\beta = 0$ (DANZER; CURRIER, 1998). O teste   conduzido da seguinte forma:

Inicialmente, devem ser calculados os desvios padrão da inclina o (s) e do intercepto (s). Em seguida, devem ser calculados os valores de t_{calc}^a para a inclina o e intercepto pelas Equa es 6.16 e 6.17:

$$t_{calc,a} = \frac{|a - \alpha|}{S_a} \quad (\text{Eq. 6.16})$$

$$t_{calc,b} = \frac{|b - \beta|}{S_b} \quad (\text{Eq. 6.17})$$

Finalmente, os valores obtidos para t_{calc} devem ser comparados com o valor de $t_{v, (1-\alpha)}$ tabelado, considerando o número de graus de liberdade como $(p - 2)$ para um modelo linear, onde p é o número de níveis de concentração da calibração.

- Se o $t_{calc} < t_{crit, \alpha, v}$, o valor do parâmetro de calibração não é significativamente diferente do valor teórico esperado, não sendo estatisticamente significativo;
- Se o $t_{calc} > t_{crit, \alpha, v}$, o valor do parâmetro de calibração é significativamente diferente do valor teórico esperado, sendo estatisticamente significativo.

No caso de o parâmetro não ser significativamente diferente do valor teórico esperado, o valor que deve ser considerado para o parâmetro de calibração na equação da curva deve ser o valor teórico $\alpha = 1$ e/ou $\beta = 0$, e não o valor estimado experimentalmente.

Limite de detecção (LD)

Em termos gerais, o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser distinguida com confiabilidade do valor zero (não detecção do analito) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O limite de detecção (LD) de um método analítico é, portanto, a menor concentração do analito na amostra que o método é capaz de detectar, mas não necessariamente quantificar com precisão e exatidão adequadas (EURACHEM, 1998; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

O limite de detecção é um parâmetro intimamente relacionado com a sensibilidade do método analítico, de maneira que, principalmente para as análises de traços e contaminantes, é desejável que possua os valores mais baixos possíveis, obtendo-se, assim, um método mais sensível. Do

ponto de vista prático, é importante que se compreenda a diferença entre o limite de detecção do método propriamente dito e o *limite de detecção instrumental*, que é a menor concentração do analito que o instrumento analítico é capaz de detectar em uma condição ideal, como numa solução padrão do analito em solvente puro. O limite de detecção instrumental não reflete o LD do procedimento analítico, pois se trata de uma estimativa executada em uma condição livre das possíveis interferências da amostra e limitações do método que podem afetar a estimativa de LD real.

Os limites de detecção instrumentais reportados pela literatura ou manuais de fabricantes de equipamentos analíticos são, muitas vezes, significativamente menores do que os limites de detecção práticos dos métodos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Procedimentos para estimativa do limite de detecção

Existem várias abordagens recomendadas para a estimativa experimental do limite de detecção, em diferentes fontes da literatura e guias. Dependendo da natureza do método, se é instrumental ou não instrumental, há procedimentos que são mais convenientes para a estimativa.

Método baseado na avaliação visual

Esse método pode ser empregado para estimativa de LD em métodos instrumentais e não instrumentais. Baseia-se na análise de amostras com concentrações conhecidas decrescentes do analito até o estabelecimento da menor concentração a qual o método foi capaz de detectar de maneira confiável (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005). Em métodos cromatográficos, a estimativa pode ser baseada na distinção entre *ruído* e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

Para a estimativa de LD por meio desse método, é necessário que o laboratório possa obter amostras isentas do analito para que possam ser fortificadas nas concentrações decrescentes e analisadas até o nível no qual a detecção começar a ficar problemática.

Método baseado na relação sinal/ruído

Esse caminho para a estimativa de LD é viável apenas para métodos que expressam o ruído da linha base, que é o caso dos métodos cromatográficos. Para avaliar a relação sinal/ruído, pode ser feita a comparação de sinais obtidos para amostras em baixas concentrações conhecidas do analito e sinais de um branco da amostra (matriz isenta do analito). A concentração mínima que pode ser detectada do analito com o método pode ser estimada como aquela na qual a relação sinal/ruído seja de 3:1 ou 2:1, sendo essas relações comumente recomendadas para estimativa de LD. Os instrumentos para cromatografia possuem em seus *softwares* ferramentas de integração da área de pico e ruído que auxiliam na estimativa de LD (RIBANI et al., 2004; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

Método baseado no desvio padrão da resposta e na inclinação das curvas de calibração

Nesse método, o limite de detecção pode ser estimado pela Equação 6.18:

$$LD = 3,3 * \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 6.18})$$

Em que:

s = desvio padrão da resposta analítica;

S = inclinação da curva de calibração.

A inclinação da curva de calibração pode ser obtida diretamente da equação de regressão da curva do método para o analito em questão. O desvio padrão da resposta analítica pode ser estimado por uma variedade de caminhos, entre eles: (a) com base no desvio padrão do branco da amostra; e (b) baseado na curva de calibração (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

(a) Com base no desvio padrão do branco da amostra: a medida da magnitude da resposta analítica de fundo (ruído) pode ser conduzida pela medida da resposta de um número apropriado de brancos da amostra e do desvio padrão dessa resposta (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005). Alguns guias recomendam que seja feita a medida de, pelo menos, 10 amostras de branco e, em seguida, calculado o desvio padrão da concentração média estimada nas amostras em branco (EURACHEM, 1998).

(b) Baseado na curva de calibração: uma curva de calibração específica deve ser avaliada empregando amostras contendo o analito na faixa possível para o LD. O desvio padrão residual ($s_{y,x}$) da linha de regressão ou o desvio padrão dos interceptos das linhas de regressão podem ser aplicados como desvio padrão da resposta (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

O limite de detecção, apesar de seu conceito simples do ponto de vista analítico, é um parâmetro cercado por uma série de problemas, como os listados abaixo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002):

- Há várias abordagens conceituais sobre o parâmetro, cada uma fornecendo uma definição um pouco diferente.
- Embora cada uma das abordagens dependa de uma estimativa de precisão no ponto zero ou próximo do ponto zero

de concentração, não está claro se essa estimativa deve ser concebida sob condições de repetitividade ou sob alguma outra condição.

- Se uma grande quantidade de dados experimentais não for coletada, a estimativa do limite de detecção estará sujeita a significativa variação aleatória.
- As estimativas de limite de detecção são, muitas vezes, tendenciosas para valores mais baixos, devido a fatores operacionais ou de má interpretação.
- As inferências estatísticas relacionadas às estimativas de limite de detecção são baseadas no pressuposto de que os dados experimentais arranjam-se segundo uma distribuição normal (gaussiana), o que é questionável em condições de baixas concentrações.

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor concentração do analito na amostra que o método é capaz de quantificar/determinar com precisão e exatidão adequadas (EURACHEM, 1998; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005). O limite de quantificação é um parâmetro indispensável em métodos desenvolvidos para determinação de analitos, dos quais se espera que estejam em níveis muito baixos de concentração, como na análise de traços, impurezas e/ou produtos de degradação. Nas estimativas de limite de quantificação, deve-se salientar que a precisão e a exatidão da concentração estimada como LQ devem ser registradas, considerando também que a precisão e a exatidão tendem a decrescer quanto menores forem os níveis de concentração do LQ. O método analítico e o seu propósito de aplicação é que devem direcionar a exigência e o critério de aceitação para LQ. Por exemplo, se o limite máximo permitido para um contaminante em uma amostra ambiental, estabelecido por algum órgão competente, é de $50\mu\text{gL}^{-1}$, o limite de quantificação de um

método analítico desenvolvido para monitorar esse contaminante deve ser $LQ \leq 50\mu\text{gL}^{-1}$. O limite de quantificação é um valor de concentração referência para a tomada de decisão (EURACHEM, 1998).

Procedimentos para estimativa do limite de quantificação

Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação pode ser estimado por diferentes métodos, sendo eles similares aos recomendados para estimativa de LD, diferenciando-se apenas quanto a questões de interpretação e critérios de estimativa.

Método baseado na avaliação visual

Baseia-se na análise de amostras com concentrações conhecidas decrescentes do analito até o estabelecimento da menor concentração a qual o método foi capaz de quantificar com precisão e exatidão aceitáveis, sendo essa considerada como limite de quantificação (LQ) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005). Como no caso da estimativa do limite de detecção, é necessário que amostras isentas do analito estejam disponíveis.

Método baseado na relação sinal/ruído

Para avaliar a relação sinal/ruído, pode ser feita a comparação de sinais obtidos para amostras em baixas concentrações conhecidas do analito com os sinais obtidos de um branco da amostra (matriz isenta do analito). A concentração mínima que pode ser quantificada do analito com o método pode ser estimada como aquela na qual a relação sinal/ruído seja aproximadamente de 10:1, sendo essa a relação tipicamente considerada como critério para LQ (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

Método baseado no desvio padrão da resposta e na inclinação das curvas de calibração

Nesse método, o limite de quantificação pode ser estimado através da Equação 6.19:

$$LQ = 10 * \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 6.19})$$

Em que:

s = desvio padrão da resposta analítica;

S = inclinação da curva de calibração.

O desvio padrão da resposta analítica (s) e a inclinação da curva de calibração (S) podem ser estimados pelos mesmos procedimentos recomendados para o LD.

Exatidão

A exatidão de uma medida descreve o grau de proximidade entre o valor da medida experimental e o “valor verdadeiro”, ou definido como verdadeiro, com base em princípios metroológicos (HARRIS et al., 2010; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012). Portanto, a exatidão de um método analítico é um parâmetro que expressa a capacidade desse método em produzir resultados mais próximos quanto possível do “valor real”. É importante que se compreenda que os termos “valor verdadeiro” e “valor real” são empregados convencionalmente, porém, do ponto vista objetivo, um valor verdadeiro/real é impossível de ser determinado, pois não há método de medição perfeito.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, ou seja, estando sempre associada a valores de precisão. Esses limites podem ser mais restritos quando o nível de concentração do analito

é mais elevado e mais amplos quando o analito está em nível traço de concentração. Existem diferentes meios para a determinação da exatidão de um método analítico, sendo eles (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI et al., 2004):

Ensaio com materiais de referência certificados (MRC)

Os materiais de referência certificados (MRCs) são materiais produzidos com a mais alta qualidade metrológica, que possuem um perfil de composição de sua matriz similar (representativo) ao da matriz da amostra real a ser analisada pelo método desenvolvido. Esses materiais de referência são acompanhados de uma documentação emitida por uma instituição reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e rastreabilidade associadas, utilizando procedimentos válidos. A documentação relativa ao MRC é emitida na forma de um certificado que reporta a concentração do analito (ou analitos) ou outra grandeza de interesse no material e a incerteza associada (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012).

Um exemplo relevante para o melhor entendimento do que seja um *material de referência certificado* (MRC) para uso em química analítica pode ser (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012):

“Material de referência para **soro sanguíneo humano (matriz)** acompanhado de um certificado com valor atribuído para a concentração de **colesterol (analito)** e incerteza associada, para uso como padrão de calibração ou como material de controle em estudos de exatidão”.

O estudo de exatidão de um método analítico via ensaios com materiais de referência certificados é baseado na análise de um número adequado de réplicas de amostras padrão do MRC pelo método. Finalmente, os resultados de concentração média e incerteza obtidos devem ser comparados estatisticamente com os valores re-

portados no certificado do material. A comparação estatística das concentrações pode ser feita pelo teste t de Student.

Estudos de comparação com método de referência

Nessa modalidade de avaliação da exatidão, é aplicado um método analítico já estabelecido e validado para servir de referência para o método analítico sob validação. O estudo é conduzido pela aplicação de ambos os métodos na análise de um número adequado de réplicas de amostras teste, preferencialmente cobrindo uma faixa útil de concentração de forma equilibrada. A comparação entre os resultados obtidos com o método de referência e com o método sob validação deve ser executada por método estatístico adequado, como, por exemplo, teste t -pareado, com a devida verificação prévia da homogeneidade das variâncias (via teste F) e a normalidade da distribuição dos resultados. Os testes estatísticos mostram se há diferença significativa entre os métodos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Ensaio de fortificação/recuperação

Quando a utilização de materiais de referência certificados ou a utilização de um método de referência não é viável para o laboratório, a exatidão pode ser avaliada pelos denominados ensaios de fortificação (*spiking*) e recuperação. Nesses ensaios, o método sob validação é usado para analisar uma porção da amostra em seu estado original e outra porção que sofreu adição (*fortificação*) de uma quantidade conhecida do analito. Os resultados são expressos quantitativamente na forma de um fator denominado de *recuperação*. A recuperação pode ser definida como sendo a proporção da quantidade da espécie química de interesse, presente na amostra, que o método é capaz de efetivamente quantificar, sendo também interpretada como uma medida da tendência (*bias*) do método (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O número de ensaios de recuperação, como também os níveis de concentração (fortificação) que devem ser avaliados nestes en-

saios, variam conforme as diretrizes adotadas pelos diferentes órgãos que emitem guias, resoluções ou manuais de orientação para validação de métodos, com tais diretrizes definidas para os seus campos de aplicação específicos. Por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define, na Resolução RE N° 899, que os ensaios devem ser conduzidos, no mínimo, em três níveis de concentração, sendo executados, pelo menos, três réplicas de determinação para cada nível, ou seja, nove determinações ao todo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Cálculo da recuperação:

$$Rec(\%) = \left(\frac{C_{det} - C_{amost}}{C_{adic.}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 6.20})$$

Em que:

C_{det} = concentração determinada na amostra fortificada com o analito;

C_{amost} = concentração determinada na amostra não adicionada (branco);

$C_{adic.}$ = concentração adicionada do analito.

Avaliando criticamente a expressão para o cálculo da recuperação, observamos que ela é expressa na forma de um percentual, ou seja, representa o percentual médio da espécie química alvo que é efetivamente quantificado na amostra pelo método analítico.

A recuperação pode ser determinada pela análise de um material de referência certificado (MRC), quando disponível, de maneira que a expressão para seu cálculo ao final dos ensaios pode ser simplificada por:

$$Rec(\%) = \left(\frac{C_{det}}{C_{adic.}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 6.21})$$

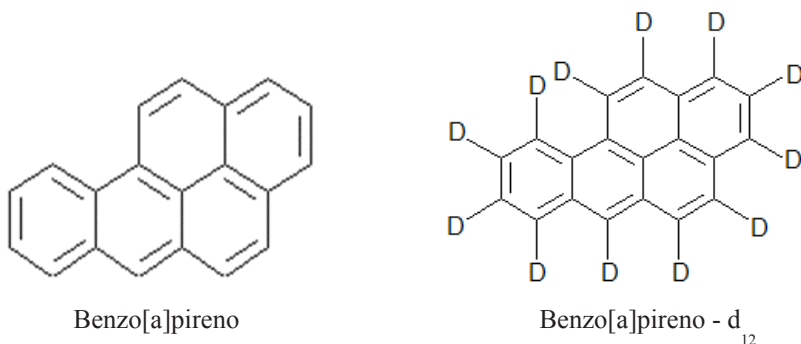
Nesse caso, o termo $C_{adic.}$ corresponde à concentração da espécie alvo reportada no certificado do material de referência. Não havendo disponibilidade de MRC, pode ser empregado um padrão *substituto* da espécie alvo, denominado tradicionalmente pelo termo em inglês *surrogate*. O padrão substituto ou *padrão surrogate* pode ser entendido como sendo um *composto ou elemento puro adicionado à amostra teste, que possui propriedades químicas e físicas similares às da espécie química alvo na sua forma nativa, simulando, portanto, o comportamento dessa espécie na amostra durante a execução do procedimento analítico*. O composto/elemento é denominado “substituto” devido ao fato de que ele é adicionado à amostra e pode não estar na mesma condição química em que se encontra a espécie alvo na sua forma nativa (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI et al., 2004).

Tipos de compostos substitutos (*surrogate*) que podem ser usados:

- *padrão analítico da espécie química alvo* adicionado à matriz ou à amostra isenta do mesmo (processo de *fortificação*);
- *padrão analítico de uma versão da espécie alvo isotopicamente modificada*;
- *padrão de um composto diferente da espécie química alvo, mas com comportamento químico representativo de seu comportamento*.

Por exemplo, um padrão substituto (*surrogate*) para o hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) benzo[a]pireno pode ser um padrão de sua versão deuterada (*isotopicamente modificado*) benzo[a]pireno-d₁₂.

Figura 6.4 - Representações das estruturas moleculares do HPA benzo[a]pireno e de sua versão deuterada benzo[a]pireno-d₁₂, com a letra ²D representando os átomos de deutério substituintes dos hidrogênios (H) da molécula nativa



Fonte: Elaborada pelos autores.

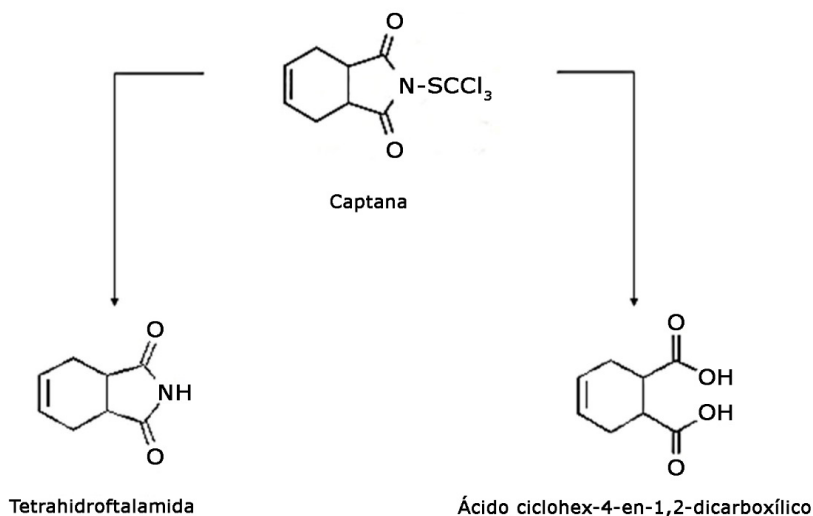
Em ensaios de recuperação nos quais se obtêm valores muito diferentes de 100%, há a indicação de que o método é afetado pela tendência/viés (*bias*) para aquele determinado analito. Objetivamente, se considerarmos as condições nas quais são executados os ensaios de recuperação, de fato, observamos que a sua estimativa só expressa a tendência (*bias*) oriunda de efeitos que atuam exclusivamente sobre o composto adicionado na amostra teste.

Essa constatação gera um problema desconfortável quanto à veracidade da aplicação dos dados de recuperação na correção dos resultados obtidos para o analito numa amostra real analisada pelo método. O problema deriva do fato de que o analito pode estar presente na amostra real em uma forma química ou diversas formas químicas (metabólitos) diferentes da do padrão adicionado, devido a processos de degradação ocorridos previamente, como é o caso do pesticida captana, que é reconhecidamente instável, podendo apresentar-se em amostras reais na forma de seus produtos de degradação tetrahidroftalamida, ácido tetrahidroftâmico e do ácido ciclohex-4-em-1,2-dicarboxílico (THOMPSON; ELLISON;

WOOD, 2002; LEHOTAY et al., 2005; UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2014).

Outro fator relevante a se considerar, principalmente em amostras sólidas, é o fato de que a distribuição do padrão do analito adicionado no seio da amostra teste pode também não refletir de maneira representativa/realista a distribuição do analito em sua forma nativa no seio da amostra real. Essas questões práticas podem potencializar conclusões otimistas sobre as recuperações do analito, que podem não refletir a realidade da análise.

Figura 6.5 - Representação das estruturas moleculares do pesticida captana e seus principais metabólitos



Fonte: Elaborada pelos autores.

A capacidade do método em quantificar o analito é também bastante dependente do nível de concentração na amostra. A variabilidade dos resultados em condições de concentração mais baixas tende a ser mais elevada, pois os menores teores da espécie química de interesse tornam sua extração e detecção mais críticas. Em virtude disso, a recuperação tem que ser avaliada dentro de uma faixa de concentração

esperada para o analito na amostra real. Existem intervalos aceitáveis para os valores de recuperação conforme o nível de concentração considerado para o analito, como também desvios padrão relativos (DPR %) recomendados para esses valores. A norma ABNT NBR 14029:2005, que dispõe sobre validação de métodos na área de agrotóxicos e afins, expressa as recuperações aceitáveis segundo seus critérios para diferentes magnitudes de concentração do analito na amostra (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005b).

Tabela 6.2 - Valores de recuperação aceitáveis conforme nível de concentração do analito

| Concentração nominal do analito na amostra | Intervalo de % de recuperação aceitável |
|---|--|
| >10% | 98,0 - 102,0 |
| 1 - 10% | 97,0 - 103,0 |
| < 1% | 95,0 - 105,0 |
| 100mgL ⁻¹ ou 100mgkg ⁻¹ | 90,0 - 107,0 |
| 10mgL ⁻¹ ou 10mgkg ⁻¹ | 80,0 - 110,0 |
| 1mgL ⁻¹ ou 1mgkg ⁻¹ | 80,0 - 110,0 |
| 100µgL ⁻¹ ou 100µgkg ⁻¹ | 80,0 - 110,0 |
| 10µgL ⁻¹ ou 10µgkg ⁻¹ | 60,0 - 115,0 |
| 10µgL ⁻¹ ou 10µgkg ⁻¹ | 40,0 - 120,0 |

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas (2005b).

Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados obtidos em testes realizados repetidamente em um mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012). Assim, a precisão de um método analítico é a capacidade desse método em gerar resultados concordantes (com baixa dispersão) para a concentração do analito em réplicas de uma mesma amostra ou amostras similares, sob condições estabelecidas.

A precisão de um método analítico pode ser avaliada com base em três níveis específicos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005):

- Repetibilidade;
- Precisão intermediária;
- Reprodutibilidade.

Para processos de validação interna (*in-house validation/single-laboratory validation*), são recomendados os estudos de repetitividade e precisão intermediária do método. A avaliação da reprodutibilidade é conduzida por meio de estudos colaborativos interlaboratoriais, sendo recomendada para processos de validação completa (*full validation*) ou quando o laboratório quer verificar o desempenho de seus métodos em relação aos dados de validação obtidos via comparação interlaboratorial (RIBANI et al., 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011).

A precisão é um parâmetro fortemente dependente da magnitude da concentração do analito na amostra, de maneira que, em condições de baixas concentrações, a quantificação do analito é mais crítica, havendo naturalmente maiores variabilidades nos resultados e, portanto, menor precisão.

Repetibilidade

A repetibilidade, também denominada de *repetitividade*, expressa a precisão dos resultados intraensaio, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos com o método para a concentração do analito em ensaios realizados com o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmos instrumentos de medição, mesmas condições de operação, num mesmo laboratório, assim como as medições sendo repetidas na mesma amostra ou em amostra similar em curto período de tempo. A

condição requerida acima é denominada de *condição de repetibilidade de medição* (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012).

Procedimento para a determinação da repetibilidade

A repetibilidade pode ser avaliada pela análise de materiais de referência certificados (MRC) ou de amostras em branco (isentas do analito) adicionadas do analito, em várias concentrações na faixa de trabalho, com um dado número de réplicas para cada concentração. A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente por meio de parâmetros estatísticos de medida de dispersão, como um desvio padrão (s), desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), associados às réplicas de medidas de cada nível de concentração, conforme Equações 6.22, 6.23 e 6.24 (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011, 2012).

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{(n - 1)} \quad (\text{Eq. 6.22})$$

Em que:

x = média aritmética das concentrações das réplicas;

x_i = valor individual de uma medição;

n = número de réplicas.

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Eq. 6.23})$$

Em que:

s = desvio padrão das medições;

x = média das medições.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100\% \quad (\text{Eq. 6.24})$$

O coeficiente de variação CV (%) pode ser interpretado como o desvio padrão relativo percentual DPR (%).

Como sugestão para a avaliação experimental da repetibilidade, pode ser conduzido o seguinte procedimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005):

- Analisar porções de amostras fortificadas com o analito ou MRC da amostra em, pelo menos, 3 níveis de concentração dentro da faixa de trabalho, sendo um nível baixo, um intermediário e um alto, com os ensaios conduzidos com um mínimo de 6 réplicas por nível de concentração avaliado, sob condições de repetibilidade.
- Após a quantificação das concentrações médias do analito nas amostras teste de cada nível, calcular o desvio padrão da repetitividade (s_r), desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) para a medida em cada nível de concentração.

Precisão intermediária

Também denominada de reprodutibilidade intralaboratorial, a precisão intermediária expressa a precisão interensaio, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos com o método para a concentração do analito em ensaios realizados com o mesmo procedimento de medição, no mesmo laboratório, em réplicas de uma mesma amostra ou amostra similar, mas alterando algumas condições, como dia da análise, analista, instrumentos de medição, condições ambientais, entre outras (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIRE-

MENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005; BRASIL, 2012). A precisão intermediária deve ser avaliada alterando-se pelo menos uma das condições de repetibilidade.

Procedimento para determinação da precisão intermediária

Como sugestão para a avaliação experimental da precisão intermediária pode ser conduzido o seguinte procedimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; BRASIL, 2012):

- Analisar porções de amostras fortificadas com o analito ou MRC da amostra em, pelo menos, 3 níveis de concentração dentro da faixa de trabalho, sendo um nível baixo, um médio e um alto, com os ensaios conduzidos com um mínimo de 6 réplicas por nível de concentração avaliado. Esse procedimento acima deve ser executado 3 vezes, cada vez em dias diferentes, variando sempre que possível o analista, os instrumentos e equipamentos de medição e as condições ambientais.
- Após a quantificação das concentrações médias do analito nas amostras teste, calcular os desvios padrão (s_{ri}) para cada nível de concentração nos diferentes dias. Com os valores de desvio padrão (s_{ri}), calcular o desvio padrão combinado ($s_{ri,c}$) para cada um desses níveis, calculando, então, o coeficiente de variação CV (%) relativo a cada nível. O coeficiente de variação CV (%), calculado com base no desvio padrão combinado ($s_{r,c}$) das diferentes concentrações, é, tradicionalmente, o parâmetro quantitativo para expressar a precisão intermediária de um método.

Cálculo do desvio padrão combinado ($s_{ri,c}$) para um dado nível de fortificação i , analisado em N dias:

$$S_{ri,c} = \sqrt{S_{i,1} + S_{i,2} + \dots + S_{i,N}} \quad (\text{Eq. 6.25})$$

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma característica que expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos com um método analítico, quando réplicas de uma mesma amostra ou amostra similar são analisadas por diferentes laboratórios, utilizando o mesmo método, sendo também denominada de precisão interlaboratorial. A reprodutibilidade avalia a precisão do método quando aplicado em diferentes locais, por diferentes analistas, com diferentes instrumentos e diferentes condições ambientais (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012).

Como dito anteriormente, a reprodutibilidade tem a necessidade de ser avaliada quando o método passa por um processo de validação completa (*full validation*), por meio de estudos colaborativos interlaboratoriais, em situações em que se deseja desenvolver um método oficial para inclusão em manuais ou publicação como norma técnica, havendo, então, a necessidade da investigação do “comportamento” do método quando executado em diferentes laboratórios.

A Iupac recomenda que a avaliação da reprodutibilidade envolva um mínimo de 8 laboratórios para que se possa tirar conclusões confiáveis a respeito da precisão interlaboratorial do método analítico (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Procedimento para avaliação da reprodutibilidade

A reprodutibilidade pode ser avaliada experimentalmente de maneira similar à repetibilidade, com a diferença de que as réplicas da amostra adicionadas com o analito serão analisadas em diferentes laboratórios, de modo que, ao final dos experimentos em todos os laboratórios, calcule-se o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial de cada nível de concentração.

Critérios de aceitação da precisão

A tabela abaixo expressa os valores limite de coeficiente de variação CV (%) recomendados para diferentes níveis de concentração/fortificação do analito na amostra (BRASIL, 2012).

Tabela 6.3 - Valores limite recomendados para CV (%) como critério de aceitação na precisão do método

| Concentração (C) | Coeficiente de Variação CV (%) | |
|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | Repetibilidade | Precisão intermediária |
| 100g/kg ≤ C < 1kg/kg | 1,3 | 2,0 |
| 10g/kg ≤ C < 100g/kg | 1,8 | 2,7 |
| 1g/kg ≤ C < 10g/kg | 2,5 | 3,7 |
| 100mg/kg ≤ C < 1g/kg | 3,5 | 5,3 |
| 10mg/kg ≤ C < 100mg/kg | 4,9 | 7,3 |
| 1mg/kg ≤ C < 10mg/kg | 6,7 | 10,0 |
| 100µg/kg ≤ C < 1mg/kg | 10,0 | 15,0 |
| 10µg/kg ≤ C < 100µg/kg | 13,4 | 20,0 |
| 1µg/kg ≤ C < 10µg/kg | 20,1 | 30,0 |
| C > 1µg/kg | 23,4 | 35,0 |

Fonte: Brasil (2012).

Robustez

A robustez de um método analítico está relacionada com a capacidade do método em produzir resultados pouco variáveis quando houver alterações em uma ou mais condições experimentais do procedimento analítico. O estudo da robustez permite avaliar a resistência do método em fornecer resultados discordantes em situações em que parâmetros que afetam a determinação da espécie química de interesse não estão nas condições ideais definidas no procedimento. Permite também avaliar a magnitude do efeito da alteração desses parâmetros sobre os resultados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; EURACHEM, 2002).

Para testar a robustez de um método analítico, devem ser introduzidas, deliberadamente, pequenas alterações nos limites estabelecidos previamente para os parâmetros/condições no protocolo inicial do método e examinar o efeito que essas alterações têm sobre os resultados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Avaliação experimental da robustez

A avaliação da robustez de um método analítico pode ser conduzida experimentalmente por meio do teste desenvolvido por Youden. Esse teste possibilita também definir a magnitude de influência de cada uma das variações sobre os resultados finais, indicando qual ou quais variações podem ser mais críticas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011).

Na execução do teste, podem ser realizados ensaios separados para determinar os efeitos da variação dos k parâmetros sobre os resultados. Por exemplo, vamos considerar um método analítico em que tenham sido definidas em seu protocolo as seguintes condições nominais de execução (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2003):

Tabela 6.4 - Condições nominais de execução do método

| Parâmetro | Condição nominal |
|----------------------------|-------------------------|
| Tempo de agitação | 10min |
| Tamanho da amostra | 5,0g |
| Concentração ácida | 1,1mol/L |
| Temperatura de aquecimento | 95°C |
| Tempo de aquecimento | 5min |
| Agitação | Sim |
| pH | 6,0 |

Fonte: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2003).

No estudo da robustez desse método, podem ser efetuadas as seguintes variações dos parâmetros:

Tabela 6.5 - Condições nominais de execução do método e variações

| Parâmetro | Condição nominal | Variação |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Tempo de agitação (1) | 10min | 12,0min |
| Tamanho da amostra (2) | 5,0g | 10,0g |
| Concentração ácida (3) | 1,1mol/L | 1,0mol/L |
| Temperatura de aquecimento (4) | 95°C | 100°C |
| Tempo de aquecimento (5) | 5min | 10min |
| Agitação (6) | Sim | Não |
| pH (7) | 6,0 | 6,6 |

Fonte: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2003).

Para a realização dos ensaios e avaliação dos resultados, é aplicada a técnica de experimento por planejamento fatorial fracionário (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Uma tabela para o planejamento dos ensaios pode ser projetada considerando os valores da condição nominal como sendo representados por sinais negativos (-), os valores relativos às variações como sinais positivos (+) e os parâmetros das condições por números de 1 a 7, indicando os 7 parâmetros, sendo, então, os 8 ensaios executados conforme a Tabela 6.6.

Tabela 6.6 - Planejamento fatorial fracionário hipotético para estudo de robustez

| Ensaio | Parâmetros | | | | | | | Resultado |
|--------|------------|---|---|---|---|---|---|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | A |
| 2 | + | + | - | + | - | - | - | B |
| 3 | + | - | + | - | + | - | - | C |
| 4 | + | - | - | - | - | + | + | D |
| 5 | - | + | + | - | - | + | - | E |
| 6 | - | + | - | - | + | - | + | F |
| 7 | - | - | + | + | - | - | + | G |
| 8 | - | - | - | + | + | + | - | H |

Fonte: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2007).

Na tabela do planejamento dos ensaios, os resultados hipotéticos foram representados por letras, de maneira que a execução do ensaio 2, por exemplo, implica a execução do procedimento analítico considerando as seguintes condições: tempo de agitação (1) como 12min (+), tamanho da amostra (2) como 10,0g (+), concentração ácida (3) 1,1mol/L (-), temperatura de aquecimento (4) 100°C (+), tempo de aquecimento (5) 5min (-), agitação (6) sim (-), pH (7) 6,0 (-), dando o resultado **B** (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2003).

Para determinar o efeito de um parâmetro sobre o resultado, devem-se observar os 4 valores do resultado obtidos em ensaios nos quais esse parâmetro foi mantido na condição de nível nominal (sinais negativos) e os 4 valores dos resultados obtidos em ensaios executados sob condições de variação (sinais positivos). Por exemplo, a magnitude do efeito da variação do parâmetro concentração ácida (3) sobre o resultado pode ser estimada pela Equação 6.26:

$$Efeito(3) = \frac{(A + C + E + G)}{4} - \frac{(B + D + F + H)}{4} \quad (\text{Eq. 6.26})$$

Observe-se que os valores dos resultados **A**, **C**, **E** e **G** são relativos aos ensaios **1**, **3**, **5** e **7**, respectivamente, ensaios nos quais o parâmetro em questão encontra-se nas condições relativas à variação imposta. Já os resultados **B**, **D**, **F** e **H** são relativos aos ensaios **2**, **4**, **6** e **8**, ensaios nos quais o parâmetro 3 (concentração ácida) encontra-se nas condições nominais (sinais negativos). A mesma lógica pode ser considerada no cálculo dos efeitos dos demais parâmetros.

Após estimativa de todos os efeitos, deve ser feita análise crítica das variabilidades dos resultados para os diferentes ensaios com base em avaliações estatísticas. Em caso de um ou mais parâmetros possuir influência significativa sobre os resultados, deve-se fazer controle rigoroso destes durante a execução do método em condições de rotina.

Incerteza da medição

Muitas decisões importantes são tomadas com base em resultados de análises químicas quantitativas, de maneira que é de suma importância que os analistas e usuários dos resultados tenham alguma indicação de sua qualidade para a tomada de decisão coerente. A incerteza de medição dos resultados obtidos por um método analítico é um parâmetro útil para avaliação da sua confiabilidade (EURACHEM, 2002).

Uma definição geral, do ponto de vista metrológico, para a *incerteza de medição* seria: “Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um *mensurando*, com base nas informações utilizadas” (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012).

Dentro do contexto da análise química, a incerteza da medição pode ser entendida como sendo um parâmetro que é associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao valor da medida analítica (EURACHEM, 2002). Como em análise química quantitativa, geralmente, o resultado da medição é a concentração de uma espécie química alvo (*mensurando*),

a incerteza da medição expressa o intervalo de valores de concentração que podem ser associados ao valor médio corrigido dessa concentração.

A incerteza da medição pode ser expressa quantitativamente como um *desvio padrão* (ou um múltiplo dele), ou metade de um intervalo de valores correspondentes a um dado nível de confiança. O parâmetro de incerteza da medição é constituído, em geral, de muitas fontes ou componentes que podem ser provenientes de efeitos sistemáticos, como componentes associados às correções e a valores atribuídos a padrões, assim como a *incerteza definicional*. Alguns desses componentes de incerteza podem ser estimados com base na distribuição estatística de uma série de medições, sendo caracterizados como desvios padrão experimentais (denominada estimativa Tipo A). Outros componentes, que também são expressos como desvios padrão, são avaliados por meio de distribuições estatísticas assumidas, baseadas na experiência do analista ou em informações fundamentadas em manuais técnicos de fabricantes de instrumentos ou guias (denominada estimativa Tipo B) (EURACHEM, 2002; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012). Cada fonte de incerteza é expressa na forma de uma **incerteza padrão u_i** . As incertezas padrão são combinadas matematicamente para se obter a **incerteza padrão combinada u_c** , que pode ser entendida como a *incerteza total* da medição. Para a maioria das aplicações em química analítica, o parâmetro de incerteza reportado no resultado final da análise é a **incerteza expandida U** , que expressa o intervalo de valores no qual se acredita que o valor real do mensurando esteja, com um dado nível de confiança. A incerteza expandida é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada por um **fator de abrangência k** .

Considerando o senso comum, o termo *incerteza* sugere a ideia de dúvida, porém, a *incerteza da medição* não implica dúvida em relação à validade dos resultados. Pelo contrário, o conhecimento da incerteza da medida serve de base para uma maior confiança na validade dos resultados.

O processo de estimativa da incerteza da medição

O processo de estimativa da incerteza de medição em um método analítico segue uma série de etapas lógicas fundamentais para que a estimativa seja conduzida da maneira mais clara possível. O processo global é constituído das seguintes etapas (EURACHEM, 2002):

1. Especificação do mensurando

Esse é o passo inicial no processo de estimativa da incerteza da medição. O mensurando, na terminologia metrológica, é a grandeza que se deseja medir por um método de medição. Como dito anteriormente, de uma forma geral, o *mensurando*, em química analítica, trata-se da concentração de uma dada espécie química numa amostra de interesse (*concentração do analito*). Por exemplo, em uma situação em que se deseja determinar metanol (CH_3OH) em mg/100mL em aguardente, o mensurando é definido exatamente como sendo a **concentração de CH_3OH em mg/100mL**.

O mensurando deve ser declarado de maneira clara e objetiva, devendo também ser declarada a relação matemática do mensurando com outras grandezas de entrada das quais ele depende (*relação funcional*).

2. Identificação das fontes de incerteza

Nessa etapa, devem-se listar as possíveis fontes de incerteza, incluindo as incertezas padrão das grandezas presentes na relação funcional do mensurando com as grandezas das quais ele depende, podendo também incluir outras fontes. Esse processo pode ser conduzido por meio dos *diagramas de causa e efeito*.

3. Quantificação dos componentes de incerteza

Nessa fase, deve-se medir ou estimar a dimensão de cada componente de incerteza associado a cada potencial fonte listada na etapa anterior. Geralmente, é possível estimar ou determinar uma única contribuição à incerteza associada a diversas fontes distintas. É fundamental

considerar se os dados disponíveis abrangem suficientemente as fontes de incerteza e planejar experimentos para estudos adicionais visando a assegurar que todas as fontes sejam adequadamente consideradas.

4. Cálculo da incerteza combinada

O levantamento de informações feito na fase anterior possibilitará o conhecimento quantitativo das contribuições de incerteza consideradas para a incerteza total da medida. Essas contribuições devem ser expressas como desvios padrão, sendo finalmente combinadas conforme método matemático apropriado para a obtenção da incerteza padrão combinada u_c . Por fim, a incerteza expandida U deve ser calculada com base no fator de abrangência k apropriado.

Cálculo da incerteza padrão combinada

Com todas as incertezas padrão quantificadas u_p , a incerteza combinada pode ser calculada por dois caminhos matemáticos diferentes, que são aplicados conforme o modelo matemático da relação funcional do mensurando com os componentes de incerteza (EURACHEM, 2002):

Método 1

Para relações funcionais que incluem apenas operações de soma e/ou subtração na equação de definição do mensurando, por exemplo, um mensurando y que está relacionado com as grandezas p , q e r pela seguinte relação funcional:

$$y = p + q - r \quad (\text{Eq. 6.27})$$

A incerteza combinada deve ser calculada pela Equação 6.28:

$$u_c(y) = \sqrt{u_p^2 + u_q^2 + u_r^2} \quad (\text{Eq. 6.28})$$

Método 2

Para relações funcionais que incluem apenas operações de multiplicação e/ou divisão na equação de definição do mensurando, por exemplo, um mensurando y que está relacionado com as grandezas p , q e r pela seguinte relação funcional:

$$y = \frac{p}{q * r} \quad (\text{Eq. 6.29})$$

A incerteza combinada deve ser calculada pela Equação 6.30:

$$u_c(y) = y * \sqrt{\left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_q}{q}\right)^2 + \left(\frac{u_r}{r}\right)^2} \quad (\text{Eq. 6.30})$$

Em que: u_p , u_q e u_r são as incertezas padrão relativas aos componentes de incerteza das grandezas p , q e r que definem o mensurando y , considerando que p , q e r são os valores médios dessas grandezas.

Cálculo da incerteza expandida

A incerteza expandida pode ser calculada pela multiplicação do fator de abrangência k pela incerteza padrão combinada (Equação 6.31), calculada por um dos métodos anteriores. Para a maioria das aplicações, recomenda-se que $k = 2,00$, porém esse valor pode ser determinado por caminhos mais criteriosos.

$$U = k * u_c \quad (\text{Eq. 6.31})$$

O resultado final de uma análise química deve ser expresso na seguinte forma geral:

$$\bar{x} \mp U \quad (\text{Eq. 6.32})$$

Em que: x representa o resultado médio corrigido da concentração do analito, e U , a incerteza expandida.

Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003*: anexo: guia para validação e métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42>. Acesso em: 15 out. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *ABNT NBR ISO/IEC 17025*. Rio de Janeiro, 2005a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *ABNT NBR 14029*. Rio de Janeiro, 2005b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Manual de garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos*. Brasília: MAPA/ACS, 2012.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry - Part I. Fundamentals and single component calibration (Iupac Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.*, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

EURACHEM. *Guia Eurachem/Citac*: determinando a incerteza na medição analítica. 2002. Disponível em: <<http://allchemistry.iq.usp.br/pub/metabolizando/Beta021115.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods*: a laboratory guide to method validation and related topics. 1998. Disponível em: <http://www.fao.org/uploads/media/Eurochem_1998_fitness_for_purpose-valid_02.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2015.

HARRIS, D. C. *Quantitative chemical analysis*. 8. ed. New York, 2010.

HUBER, L. *Validation of analytical methods*. Germany: Agilent Technologies, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. *Validation of analytical procedures*: text and methodology Q2 (R1). EU, USA, Japan, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *DOQ-CGCRE-008*: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 01, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *DOQ-CGCRE-008*: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 02, jun. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *DOQ-CGCRE-008*: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 04, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *Vocabulário internacional de metrologia*: conceitos fundamentais e gerais de termos associados. Duque de Caxias, RJ, 2012.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Guidelines for calibration in analytical chemistry - Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl. Chem.*, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. *Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a practical approach*. Boca Raton: CRC Press, 2009.

LEHOTAY, S. J. Validation of fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LIGIERO, C. B. P. et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Pearson, Harlow, 2010.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em Química Analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. Pesticides properties database (PPDB): captan. University of Hertfordshire. Disponível em: <<http://www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide residue analysis: an overview. *Mass Spectrom Rev.*, v. 3, p. 45-85, 2004.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

RAVICHANDRAN, V. et al. Validation of analytical methods: strategies & importance. *Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci.*, v. 2, p. 18-22, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SKOOG, D. A. et. al. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, 2005. 1124 p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Ronaldo Ferreira do Nascimento
Jhonyson Arruda Carvalho Guedes
Aparecida Liberato Milhome
Fátima Itana Chaves Custódio Martins
Vítor Paulo Andrade da Silva
Ari Clecius Alves de Lima
Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

O presente capítulo aborda uma discussão dos aspectos da análise qualitativa e quantitativa empregando dados experimentais referentes a análises cromatográficas reais empregando a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). Também são discutidas as principais equações matemáticas relacionadas aos métodos de quantificação usados em CGAR, a interpretação das curvas analíticas, bem como suas potenciais aplicações em análise de amostras reais.

Normalmente, após a otimização das condições cromatográficas, têm-se as etapas de análise qualitativa e quantitativa, ou seja, a análise cromatográfica total. Em suma, uma análise qualitativa objetiva identificar os componentes de interesse presentes na amostra, ao passo que a análise quantitativa se dedica a determinar o nível de concentração desses componentes na amostra.

Análise qualitativa

A execução da análise qualitativa usualmente procura identificar um número limitado de analitos (os de interesse), mas também pode visar à identificação de todos os componentes de uma amostra. A princípio, essa etapa é concebida por comparação de tempo de retenção e/ou dopagem sucessiva de padrões. Entretanto, no caso de amostras complexas, ou pelo desconhecimento do histórico da amostra, o uso de técnicas auxiliares, como a espectrometria de massa (EM), é imprescindível.

Na atualidade, a EM, associada a uma biblioteca de espectros de massas, é, frequentemente, utilizada como instrumento de identificação de componentes em amostras complexas. Contudo, o cromatografista precisa ter em mente que a mera comparação do espectro de massa adquirido com o espectro disponível previamente em uma biblioteca de espectros pode levar a uma identificação equivocada, uma vez que o banco de dados disponível sugere uma série de compostos que não necessariamente o composto alvo (DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014).

No tocante à identificação dos picos de interesse somente pelo tempo de retenção, recomenda-se uma avaliação da natureza da amostra, com relação à complexidade da matriz e/ou à presença de isômeros. Isso é muito importante para uma melhor definição da possibilidade de ocorrência de coeluição de picos (sobreposição entre o pico do composto alvo e do composto interferente). Sendo assim, desde que exista a possibilidade de coeluição de picos, é importante assegurar a precisão na análise qualitativa quando se usa o tempo de retenção como parâmetro. Um método bastante eficiente de identificação de picos baseia-se na dopagem da amostra com o próprio padrão do analito.

De qualquer maneira, é imprescindível fazer uma avaliação do perfil da amostra, em relação à complexidade da matriz e à presença de isômeros, para assegurar uma análise qualitativa confiável e eficiente dos componentes presentes. A seguir, serão detalhados

alguns procedimentos tradicionais para a identificação dos componentes de uma amostra no cromatograma.

Tempo de retenção

Na análise qualitativa clássica, em cromatografia gasosa, a identificação de um composto pode ser idealizada mediante a comparação do tempo de retenção de um padrão analítico com o do componente da amostra, sendo esse um dos parâmetros mais utilizados para a identificação de compostos (GROB; BARRY, 2004).

O tempo de retenção é característico para um determinado composto. Sendo assim, é pertinente imaginar que é possível a identificação de todos os componentes em uma mistura por comparação direta com os tempos de retenção dos padrões analíticos. De modo que, caso o padrão analítico tenha tempo de retenção similar ao de um dado composto presente na amostra, pode tratar-se do mesmo composto. Entretanto, tal resultado não é conclusivo, uma vez que dois compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção (ou muito próximos) em determinadas condições de análise (CIOLA, 1973; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS, 2009).

É importante salientar que o tempo de retenção é característico dos compostos, porém não é exclusivo. Além disso, é dependente da interação do(s) analito(s) com a fase estacionária presente na coluna cromatográfica e das condições cromatográficas operacionais, tais como fluxo do gás de arraste, temperatura da coluna e volume da amostra, o que torna esse método de identificação um tanto quanto impreciso. Dessa maneira, é necessário o uso de outros métodos para uma identificação conclusiva dos compostos investigados.

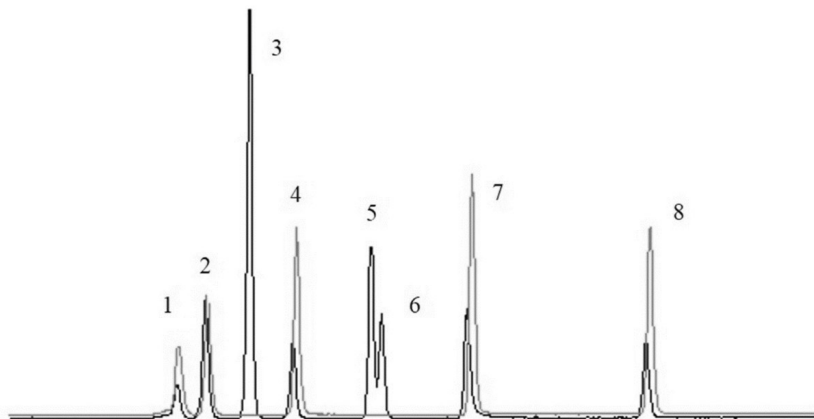
Em situações práticas, depois de verificadas as melhores condições cromatográficas, são efetuadas as análises tanto da solução da amostra como da solução do composto padrão, e, daí, efetiva-se o processo de identificação dos componentes (pi-

cos), separados na coluna, por meio do cromatograma. Para uma melhor compreensão, a Figura 7.1 ilustra cromatogramas sobrepostos referentes à análise de uma mistura de padrões de álcoois obtidos nas mesmas condições experimentais.

Comparando os cromatogramas (Figura 7.1), tomando como base os tempos de retenção, nota-se que os compostos, referentes aos picos 1, 2, 4, 7 e 8 podem ser, respectivamente, os álcoois metanol, etanol, propanol, butanol e álcool isoamílico. Porém, é necessário ter em mente que diferentes compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção e, portanto, apresentar coeluição (eluição simultânea). Assim, uma análise comparativa direta entre o tempo de retenção do analito e do padrão requer cuidados e prudência. Nesse caso, é recomendado usar outra coluna capilar de fase estacionária oposta.

Outra alternativa interessante para identificar os componentes presentes na amostra pelo tempo de retenção é a dopagem da solução amostra com padrões do analito. Essa técnica requer a adição adequada de quantidade do padrão na amostra (dopagem ou fortificação). Em seguida, a amostra é analisada no sistema cromatográfico. Caso seja observado (no cromatograma) um incremento na altura (ou área) do pico de interesse, é reforçada a ideia da presença do composto na amostra. Apesar de o método de fortificação com padrão proporcionar forte evidência da presença do composto alvo, eventuais fenômenos de coeluição de outros compostos com o mesmo tempo de retenção não podem ser descartados.

Figura 7.1 - Cromatograma de solução padrão (de cor cinza) de álcoois (metanol, etanol, propanol, butanol) superposto ao de uma amostra desconhecida (de cor preto), ambos obtidos nas mesmas condições cromatográficas. Identificação dos picos: (1) metanol, (2) etanol, (4) propanol, (7) butanol e (8) álcool isoamilico. Condições cromatográficas: $T_{\text{coluna}} = 35^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{injetor}} = 200^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{detector}} = 250^{\circ}\text{C}$, fluxo do gás de arraste (H_2) = 1mLmin^{-1} , coluna capilar ($30\text{m} \times 0,25\text{mm D.I} \times 0,25\mu\text{m}$), fase estacionária polidimetilsiloxano (DB-5)



Fonte: Elaborada pelos autores.

Índices de retenção

É bem sabido que a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é uma técnica instrumental poderosa em análise qualitativa. Entretanto, muitas vezes, os bancos de dados utilizados não são completos o suficiente para identificar muitos compostos. Além disso, devido à similaridade de algumas estruturas químicas e graus de saturação e à homogeneidade heteroatômica, o uso de índices de retenção, como ferramenta auxiliar na identificação de compostos, é bastante eficiente e usual e visa a evitar uma identificação equivocada dos compostos (VON MÜHLEN, 2009).

Índice de retenção em condição isotérmica

O índice de retenção de um dado composto é um número específico, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos lineares) eluídos antes e após o pico cromatográfico do analito de interesse (VON MÜHLEN, 2009).

O método mais empregado para a determinação do índice de retenção de compostos foi proposto por Kovats, em 1958. O índice de Kovats (I) é definido como cem vezes um número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado (t'_R) que o composto cujo índice está sendo determinado (SILVA et al., 2005). O índice de Kovats pode ser calculado pela Equação 7.1.

$$I(\text{soluto}) = 100n + 100 \left[\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right] \quad (\text{Eq. 7.1})$$

Em que:

t'_R = tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna cromatográfica);

i = analito;

n = número de carbonos do padrão adjacente menos retido;

n + 1 = número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

Determinação do índice de retenção de Kovats (I)

O índice de Kovats é sempre aplicado sob condições isotérmicas e tem sido bastante utilizado para especificar a polaridade de muitas colunas capilares, utilizando-se os polímeros usuais, tais como polissiloxanos e polietileno glicol (Tabela 7.1).

O índice de retenção (I) pode ser determinado por meio de um gráfico (Figura 7.2) que relaciona o número de átomos de carbono de

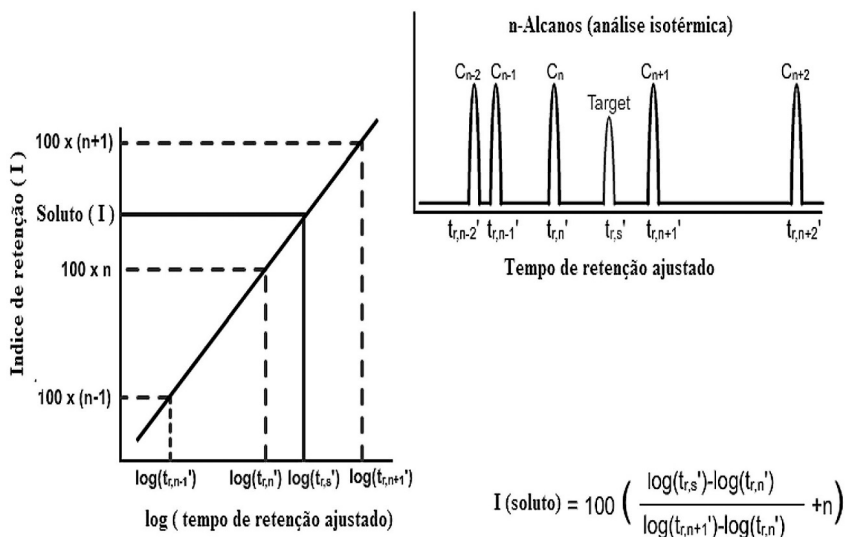
alcanos saturados normais com o logaritmo dos tempos de retenção ajustados destes alcanos, ou pelo cálculo aplicando a Equação 7.1.

Tabela 7.1 - Índice de retenção de benzeno e butanol em diversas fases estacionárias

| Fase estacionária | Polaridade da Fase | Índice de retenção (I) | |
|--|--------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Benzeno PE = 80 °C | Butanol PE = 117 °C |
| Poli(dimetilsiloxano) | Apolar | 657 | 648 |
| (Difenil) _{0,05} (dimetil) _{0,95} (polissiloxano) | Apolar | 672 | 664 |
| (Difenil) _{0,35} (dimetil) _{0,65} (polissiloxano) | Intermediária | 754 | 717 |
| (Cianopropilfenil) _{0,14} (dimetil) _{0,86} (polissiloxano) | Intermediária | 726 | 773 |
| (Difenil) _{0,65} (dimetil) _{0,35} (polissiloxano) | Intermediária | 797 | 779 |
| Poli(etilenoglicol) | Polar | 956 | 1142 |
| (Biscianopropil) _{0,95} (cianopropilfenil) _{0,1} (polissiloxano) | Polar | 1061 | 1232 |

Fonte: Adaptada de Harris (2010).

Figura 7.2 - Determinação do índice de retenção de compostos sob condições de temperatura isotérmica



Fonte: Adaptada de Shimadzu Corporation (2007a).

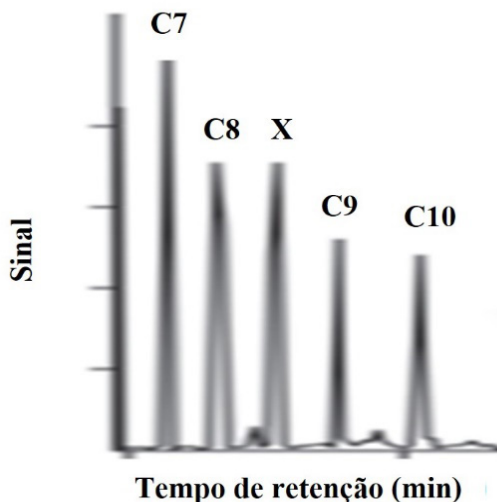
Para uma melhor compreensão da aplicação do índice de Kovats, tomemos como exemplo a determinação do índice de retenção em uma mistura de n-alcanos de C9 a C11, em que o pico referente ao composto de interesse está assinalado com a letra X (Figura 7.3). Os tempos de retenção dos compostos próximos ao pico de interesse estão listados na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 - Tempos de retenção dos picos da região de interesse referente ao cromatograma da Figura 7.3

| Composto | Tempo de retenção (t_R), (min) |
|------------------|------------------------------------|
| Hexano, C8 | 5,32 |
| Octano, C9 | 7,38 |
| Decano, C10 | 9,85 |
| Desconhecido, Cx | 6,25 |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 7.3 - Cromatograma da mistura de n-alcacos



Fonte: Adaptada de Von Mühlen (2009).

O índice de Kovats (I), calculado pela Equação 7.1, fornece o seguinte resultado:

$$I = 100 \times 8 + 100 \left[\frac{\log 6,25 - \log 5,40}{\log 7,58 - \log 5,40} \right] = 943$$

Sabendo que o índice de retenção de Kovats (I), definido como cem vezes um número hipotético, é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado (t_R') que o composto cujo índice está sendo determinado, tem-se que o composto desconhecido com $I = 943$ é eluído entre o nonano ($I = 900$) e o decano ($I = 1000$).

Na prática, inicialmente, determina-se o índice de retenção de compostos para auxiliar na confirmação (ou não) do espectro de massas com espectros da biblioteca. Os índices de retenção de 648 e 657 para butanol e benzeno (HARRIS, 2010),

respectivamente, obtidos em coluna com a fase estacionária polidimetilsiloxano (dados na Tabela 7.1) indicam que, nessa fase estacionária apolar, os compostos são eluídos, respectivamente, entre o hexano ($I=600$) e o heptano ($I=700$), ao passo que, na fase polar polietilenoglicol, o benzeno ($I=956$) é eluído entre o nonano ($I=900$) e o decano ($I=1000$), enquanto que a eluição do butanol ($I=1142$) ocorre entre o undecano ($I=1100$) e o dodecano ($I=1200$). Em suma, nota-se claramente que, à medida que se aumenta a polaridade da fase estacionária, aumenta-se o índice de retenção desses compostos.

Enquanto o índice Kovats é utilizado para especificar a polaridade de colunas capilares, quando se utilizam programas de temperatura na coluna, um valor similar pode ser calculado, sendo este denominado de índice de retenção linear (IRL) (VON MÜHLEN, 2009).

Índice de retenção linear (IRL)

O índice de retenção linear, conhecido por índice de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), é utilizado quando a corrida cromatográfica é realizada com programação linear de temperatura. A importância da determinação do IRL é refletida no fato de que a consulta à biblioteca de espectro de massas para a identificação de compostos, às vezes, não fornece resultados plenamente confiáveis, devido à complexidade das matrizes e à ineficiência das técnicas de extração. Por outro lado, o uso do IRL torna esse processo mais aprimorado. Contudo, vale ressaltar que encontrar valores de IRL de referência não é tão simples. Há uma escassez de bases de dados disponíveis na literatura. Além disso, as informações são baseadas em operações com colunas cromatográficas antigas, e, muitas vezes, encontrar alguns compostos de interesse também não é simples (VON MÜHLEN, 2009).

Em situações práticas, a determinação do índice de retenção de um dado composto é realizada em relação aos padrões

(hidrocarbonetos), com condições experimentais bem estabelecidas, tais como: o tipo de fase estacionária, a espessura do filme, as condições de temperatura (isotérmica ou programada) e outras (VON MÜHLEN, 2009).

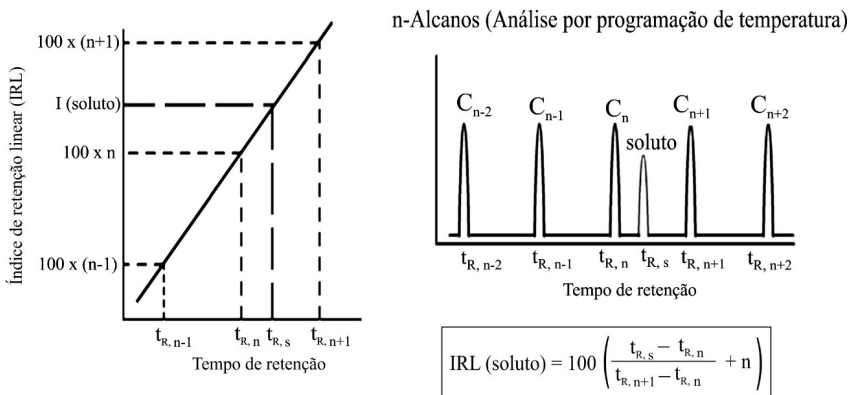
O IRL de cada componente é calculado usando os tempos de retenção ajustados dos alcanos ou aplicando a Equação 7.2. Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os valores de índice de retenção linear calculados são comparados com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade.

$$IRL = 100n + 100 \left[\frac{t_R(i) - t_R(n)}{t_R(n+1) - t_R(n)} \right] \quad (\text{Eq. 7.2})$$

Determinação do índice de retenção linear (IRL)

Na prática, um cromatograma de mistura padrão de n-alcanos é utilizado para calcular o IRL de um composto em uma dada amostra. O padrão desses alcanos é injetado no sistema cromatográfico (ex.: GC-MS), operando em condições bem estabelecidas, e seus respectivos tempos de retenção são usados como padrão externo de referência para o cálculo do IRL, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. A determinação do IRL pode ser feita como ilustrado na Figura 7.4 ou pelo cálculo aplicando a Equação 7.2.

Figura 7.4 - Determinação do índice de retenção linear de compostos sob condições de temperatura programada



Fonte: Adaptada de Shimadzu Corporation (2007b).

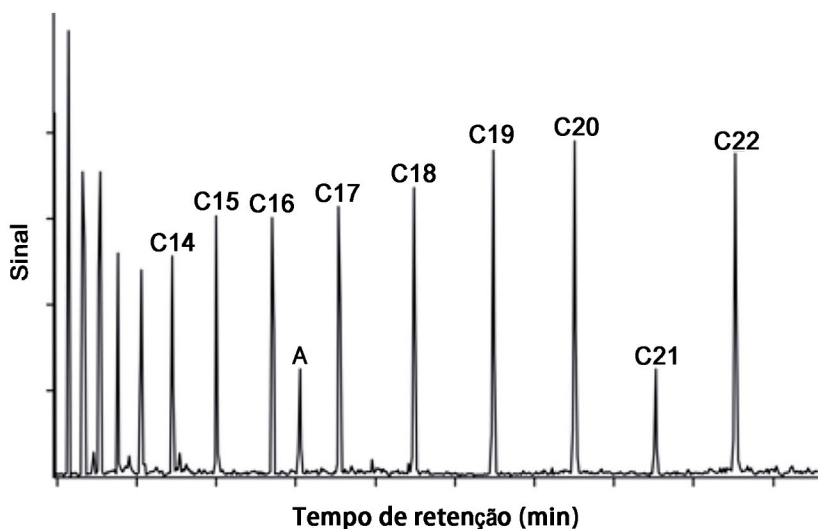
Um exemplo da aplicação desse índice na determinação do índice de retenção do composto alvo (*target*) é mostrado no cromatograma ilustrado na Figura 7.5 e na Tabela 7.3. Von Mühlen (2009) estudou a mistura de n-alcanos (adicionada à amostra) por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID). O pico do composto de interesse está assinalado como A.

Tabela 7.3 - Tempos de retenção dos alcanos da região de interesse no cromatograma da Figura 7.5

| Composto | Tempo de retenção (t_R), (min) |
|----------|------------------------------------|
| C16 | 15,42 |
| C17 | 18,92 |
| C18 | 22,83 |
| A | 16,75 |

Fonte: Adaptada de Von Mühlen (2009).

Figura 7.5 - Cromatograma de uma amostra contendo o composto A, fortificada com uma série homóloga de n-alcenos



Fonte: Cópia autorizada de Von Mühlen (2009).

Considerando que a análise cromatográfica foi realizada com programação linear de temperatura, o índice de retenção linear (IRL) do composto desconhecido pode ser calculado com base na Equação 7.2, obtendo-se um valor de 1638, como mostrado a seguir:

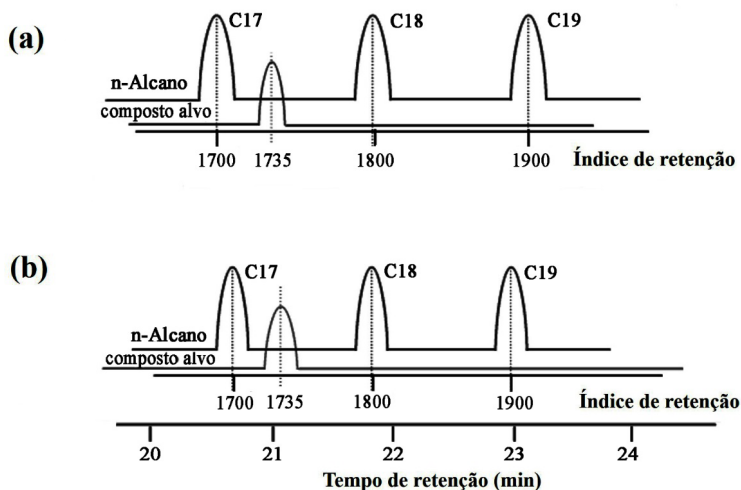
$$IRL = 100 \times 16 + 100 \left[\frac{16,75 - 15,42}{18,92 - 15,42} \right] = 1638$$

O IRL calculado é, então, comparado com os índices de retenção tabelados. De acordo com Von Mühlen (2009), o valor de IRL 1638 indicou que o composto desconhecido eluiu entre os n-alcenos C16 e C17, mais próximo do C16 do que do C17, em uma escala de 0 a 99.

Identificação usando índice de retenção linear (IRL)

O uso de IRL aumenta a certeza da pesquisa de banco de dados e também promove o ajustamento do método quando ocorre a troca do comprimento da coluna cromatográfica. Como já mencionado, para usar o IRL, é necessário desenvolver análises cromatográficas de n-alcenos e relacionar o índice de retenção linear com o tempo de retenção (t_r). Usando essa relação, o IRL do composto alvo é registrado. Empregando a troca de uma coluna longa por uma curta, como ilustrado na Figura 7.6, pode-se encontrar o pico alvo com o tempo de retenção esperado na coluna curta.

Figura 7.6 - Identificação de compostos pelo índice de retenção linear usando coluna longa (a) e coluna curta (b)



Fonte: Adaptada de Shimadzu Corporation (2007c).

Uma discussão mais aprofundada sobre a aplicação e cálculo do índice de Kovats e dos índices de retenção com programação linear de temperatura para cromatografia de gás pode ser encontrado nos trabalhos de Castelo (1999), Harangi (2003), Görgényi, Dewulf e Van Langenhove (2006) e Girard (1996).

Identificação de compostos usando métodos analíticos auxiliares

Detectores mais seletivos podem ser utilizados visando a auxiliar na identificação de determinados compostos. Mais informações podem ser consultadas no capítulo sobre os detectores e suas aplicações. Outra alternativa interessante na identificação de compostos é a utilização de dois detectores distintos em paralelo. Os detectores selecionados devem ter grandes diferenças de sensibilidade para diferentes classes de compostos (MCNAIR; MILLER, 2009). Os detectores não destrutivos podem ser utilizados de duas formas distintas, tais como são apresentadas a seguir (LANÇAS, 2009):

- Acoplamento em linha (*on-line*): Conectando o instrumento adequado (EM, UV-Vis, RMN etc.) diretamente à saída do cromatógrafo e analisando os picos à medida que forem eluídos. Desse modo, a amostra é analisada logo após a eluição cromatográfica, proporcionando, assim, um menor tempo de análise.
- Fora de linha (*off-line*): Aprisionando os compostos eluídos em recipientes apropriados e, posteriormente, analisando-os no instrumento adequado (MCNAIR; MILLER, 2009). Tal método implica consumo de tempo para aprisionar a amostra, prepará-la de forma adequada para o outro instrumento e depois efetuar a análise propriamente dita. Essa etapa adicional é altamente suscetível à introdução de erros e contaminações no processo, o que não ocorre no sistema em linha. Este último, normalmente, apresenta um custo mais elevado, requerendo, muitas vezes, uma interface para se acoplar o cromatógrafo ao sistema auxiliar em linha. Todavia, é importante salientar que, no uso da cromatografia gasosa capilar, somente uma diminuta quantidade de amostra é introduzida no injetor (microlitros), e grande parte dos detectores usados em cromatografia gasosa são

destrutivos, com algumas exceções, como o detector de condutividade térmica.

Análise quantitativa

Posteriormente à análise qualitativa, na qual são identificados os analitos de interesse, normalmente, é realizada a análise quantitativa, visando a mensurar a quantidade do analito presente em uma dada amostra.

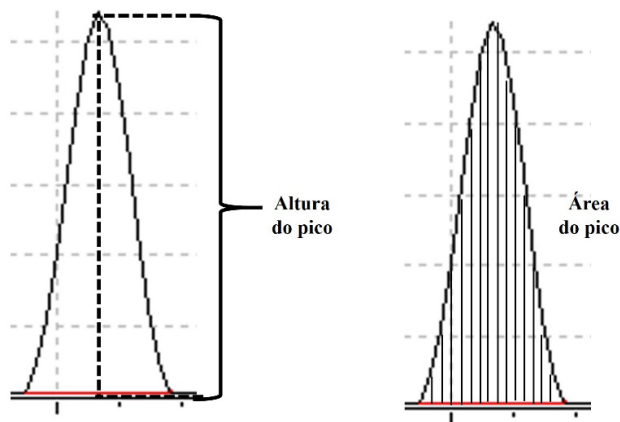
Um requisito básico para a quantificação de forma confiável é o desenvolvimento e a validação de um método analítico, incluindo os procedimentos de amostragem, preparo da amostra e análise dos analitos de interesse. Nesse contexto, no que diz respeito ao método cromatográfico, alguns parâmetros necessitam de otimização, como o modo de injeção, a seleção da coluna, a programação de temperatura e o método de detecção. Dessa maneira, serão obtidos picos simétricos o suficiente para a quantificação adequada dos analitos (DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014).

A fim de quantificar um analito, a relação entre a extensão do sinal analítico oriundo do detector e da concentração ou massa do analito deve ser estabelecida. Geralmente, tal relação é obtida pela análise de padrões analíticos com concentrações conhecidas. Na análise cromatográfica, o aumento do sinal proveniente do detector, na maioria dos casos, de forma linear, implica um aumento na quantidade do analito. Sendo assim, essa correlação é a base para a análise quantitativa (DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014).

Usualmente, uma análise quantitativa em cromatografia é baseada na comparação da resposta do detector (área ou altura do pico) com a massa injetada do composto padrão (com concentração conhecida). Desse modo, é verificada a relação de proporcionalidade dessa correlação. Sabendo que o tamanho de um pico cromatográfico é proporcional à quantidade de um dado analito em uma dada amostra, tem-se a necessidade de determinação do tamanho do pico cromatográfico, objetivando quantificar o analito.

Dois conceitos básicos podem ser utilizados para medir o tamanho do pico. O primeiro é simplesmente a medida da altura do pico, e o segundo envolve a medição da área do pico. Cada técnica, quando usada corretamente, é um meio aceitável para a quantificação (GROB; BARRY, 2004). Assim, a integração da resposta do detector pode ser concebida medindo-se a altura do pico, a área do pico (área do triângulo), o peso do papel, a integração eletromecânica (desuso) e os integradores eletrônicos (computador). A Figura 7.7 ilustra os procedimentos de integração de picos por meio da altura e da área do pico cromatográfico.

Figura 7.7 - Procedimentos de integração da altura e da área do pico



Fonte: Elaborada pelos autores.

Técnicas de integração de pico

A integração de um pico cromatográfico tem como objetivo relacionar o tamanho do pico com a quantidade de analito presente em uma dada amostra. A seguir, serão dados mais detalhes dos dois tipos mais comuns de integração.

Medida da altura do pico

A medida da altura do pico (h) é determinada pela distância entre o valor máximo do pico e a linha da base. Esse procedimento é concebido por intermédio de aproximações, em que é traçada a melhor linha de base possível entre o início e o fim do pico e mede-se a altura dessa linha de base até o máximo do pico cromatográfico, tal como ilustrado na Figura 7.7. A medida da altura do pico é um procedimento simples e rápido quando comparado à medida da área do pico, sendo preferida por muitos cromatografistas. Contudo, esse procedimento não é recomendado para picos mal resolvidos e/ou muito pequenos (LANÇAS, 2009).

Os detectores utilizados em cromatografia gasosa fornecem respostas que podem ser associadas à altura do pico, a qual é usualmente proporcional à massa do soluto injetada ou à sua concentração. Por outro lado, a altura do pico é inversamente proporcional à largura do pico, portanto, os parâmetros que afetam a largura do pico devem ser mantidos constantes. Fenômenos de alargamento da banda cromatográfica devem ser fortemente considerados e minimizados quando se utiliza a altura do pico como o principal parâmetro na análise quantitativa.

Diversos parâmetros cromatográficos podem promover alterações na largura e, conseqüentemente, na altura do pico, tais como (DYSON, 1998; GROB; BARRY, 2004; DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014):

- Temperatura da coluna: alterações na temperatura da coluna podem afetar a largura e, conseqüentemente, a altura do pico. Esse parâmetro é importante quando se trabalha sob condições isotérmicas. À vista disso, caso ocorra variação da temperatura da coluna em 1°C , o tempo de retenção (t_R) poderá ser alterado em até 3%.
- Fluxo do gás: a variação da taxa de fluxo do gás em 1% também pode promover alterações no tempo de retenção

do composto. Sob condições isotérmicas, a largura e a altura do pico também são alteradas em 1%.

- Temperatura do detector: a temperatura do detector deve ser mantida constante, para que assim sejam obtidas análises reprodutíveis.
- Injeção da amostra: os parâmetros de velocidade e modo de injeção (*splitless* e *split*) influenciam no tempo necessário para transferir os analitos para a coluna cromatográfica, de modo que processos de transferência de massa mais lentos causam alargamento do pico cromatográfico, e, conseqüentemente, têm-se alterações na altura do pico.
- Sobrecarga de amostra na coluna: a injeção de grandes quantidades de amostra pode exceder a capacidade da coluna, especialmente no caso de as colunas serem capilares (estreitas com filmes finos) e se a solubilidade dos analitos na fase estacionária for baixa (por exemplo, analitos muito polares, fases estacionárias pouco polares e vice-versa). Isso resulta em picos mais largos. Assim sendo, a altura do pico não é proporcional à quantidade de analito.

Medida da área do pico

A área do pico é determinada pela integração da altura com o tempo de retenção (ou volume de retenção) e reflete a massa total do composto eluído. Na integração da área do pico, é preciso levar em conta os efeitos de assimetria e de calda dos picos para não comprometer a relação de proporcionalidade entre área do pico e massa do soluto.

A área do pico cromatográfico que representa o composto de interesse pode ser calculada mediante o uso das Equações 7.3 ou 7.4. Os parâmetros necessários para o cálculo são extraídos do próprio pico. A Figura 7.8 ilustra o método para cálculo dos parâmetros cromatográficos necessários para a determinação manual da área de um pico.

$$A = \frac{hW_b}{2} \quad (\text{Eq. 7.3})$$

$$A = (h W_{1/2}) \quad (\text{Eq. 7.4})$$

Em que:

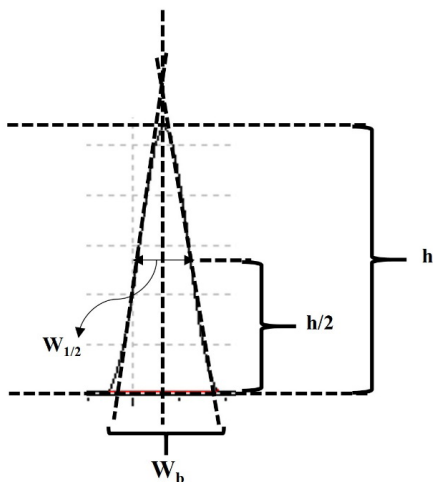
A = área do pico;

h = altura do pico;

W_b = largura da base;

$W_{1/2}$ = largura do pico na meia altura.

Figura 7.8 - Cromatograma ilustrando o método de determinação dos parâmetros altura do pico (h), meia altura (h/2), largura do pico na base (W_b) e largura do pico na meia altura ($W_{1/2}$), necessários para o cálculo da área de um pico cromatográfico

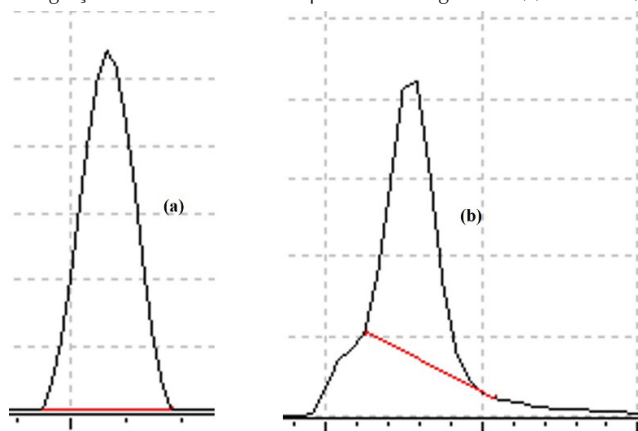


Fonte: Elaborada pelos autores.

Por outro lado, na técnica de integração eletrônica da área do pico usando métodos computacionais, em muitos casos, não são considerados os efeitos de assimetria dos picos, desse modo, é recomendada a integração manual para os casos críticos. Isso permite

um cálculo mais real e preciso da área do pico. Contudo, a técnica de integração eletrônica apresenta as vantagens de ser mais prática, rápida e precisa. As Figura 7.9a e 7.9b ilustram casos reais sem e com a necessidade da integração manual.

Figura 7.9 - Integração eletrônica da área de picos cromatográficos: (a) correta e (b) incorreta



Fonte: Elaborada pelos autores.

Métodos de quantificação

Uma vez que conhecemos as técnicas de medição da área e da altura do pico cromatográfico, o próximo passo é relacionar o tamanho do pico com a quantidade de analito presente em uma dada amostra. A base da quantificação é quase sempre uma comparação da área do pico referente ao analito com a área do pico referente ao padrão analítico em uma quantidade conhecida.

Entre os métodos de quantificação mais utilizados em cromatografia, temos o de *normalização*, *padrão externo*, *superposição de matriz*, *adição de padrão* e *padrão interno*, sendo que este último é o único que corrige a variação do sinal resposta, visto que relaciona

a resposta do analito com a resposta do padrão interno (a ser discutido posteriormente com mais detalhes).

De modo geral, o método de quantificação selecionado deve fornecer a melhor exatidão possível e um alto nível de precisão. Deve ainda atingir esses objetivos em um menor tempo de análise possível, com um mínimo de envolvimento do operador, além de utilizar pouca quantidade de amostra. O método de quantificação “ideal” dependerá da amostra específica, do número de amostras, da complexidade da matriz, da possibilidade de automação e da disponibilidade de padrões (RIBANI et al., 2004).

Método de normalização

O método de normalização consiste em comparar a área obtida no cromatograma com a porcentagem de composição da mistura. Esse método semiquantitativo quase sempre não utiliza um padrão cromatográfico e requer que todos os compostos de interesse presentes na amostra sejam eluídos da coluna e detectados com idêntica resposta (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; MCNAIR; MILLER, 2009).

Na análise quantitativa por normalização, é realizado o cálculo da porcentagem relativa de cada composto ($A_1, A_2, A_3 \dots A_n$) presente na amostra, com base na área total ($A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$), de acordo com a Equação 7.5.

$$\%A_1 = \left[\frac{\text{Área}_{A_1}}{\text{Área total } (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7.5})$$

Em que:

$\%A_1$ = porcentagem de qualquer componente específico da amostra;

A_1, A_2, A_3 e A_n = áreas dos picos dos solutos presentes na amostra.

Caso seja a altura do pico o parâmetro quantitativo, a porcentagem é calculada mediante a Equação 7.6:

$$\%h_1 = \left[\frac{\text{Altura}_{H_1}}{\text{Altura total dos picos } (h_1+h_2+h_3+\dots+h_n)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7.6})$$

Em que:

$\%h_1$ = porcentagem de qualquer componente específico da amostra;

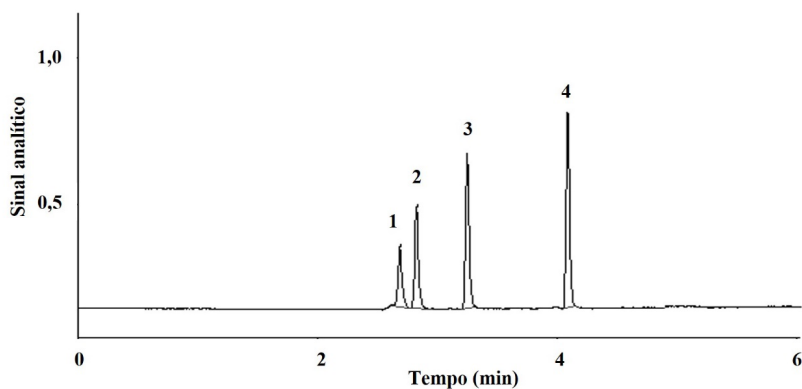
h_1, h_2, h_3 e h_n = alturas dos picos dos solutos presentes na amostra.

Entretanto, é preciso ter em mente que nem sempre, em uma análise cromatográfica, todos os compostos presentes na amostra são totalmente eluídos. Além disso, raramente, o detector apresenta a mesma resposta para todos os compostos. Na prática, isso se traduz na obtenção usual de um cromatograma com diversos picos com áreas (ou alturas) diferentes, ou seja, dificilmente, o detector apresenta a mesma sensibilidade para todos os componentes presentes em uma dada amostra. Portanto, em uma análise real, por exemplo, de uma mistura aquosa equimolar de álcoois, metanol, etanol, propanol e butanol, por cromatografia gasosa, com o detector de ionização de chama, como observamos na Figura 7.10, os picos apresentam, relativamente, áreas e alturas diferentes.

Nesse contexto, o cálculo da composição centesimal da amostra, usando a Equação 7.5, fornece valores percentuais diferentes para os álcoois metanol, etanol, propanol e butanol presentes na mistura equimolar, e isso constitui um sério erro quantitativo. Como já foi mencionado anteriormente, o cromatograma da mistura equimolar dos álcoois (Figura 7.10) ilustra que a altura dos picos é diferente para cada composto, e isso reflete diretamente no cálculo da área dos picos, sobretudo na composição final da mistura. Por outro lado, esses resultados refletem muito bem a limitação do método de normalização, uma vez que era esperada uma resposta percentual igual para cada componente presente na solução equimolar. Consequen-

temente, sabendo que essa situação é muito comum, ou seja, a resposta de um dado detector é geralmente diferente para cada soluto, então, a correção da área dos picos por fator de correção é necessária para expressar a composição centesimal verdadeira da amostra.

Figura 7.10 - Cromatograma de solução aquosa equimolar de álcoois (30mgL^{-1}) obtido com detector de ionização de chama (DIC). Identificação dos picos: (1) metanol, (2) etanol, (3) propanol e (4) butanol. Condições cromatográficas: temperatura da coluna 35°C , temperatura do injetor 200°C , temperatura do detector 250°C , fluxo do gás de arraste (H_2) = 1mlmin^{-1} . Coluna polidimetilsiloxano (DB-5) ($30\text{m} \times 0,25\text{mm D.I} \times 0,25\mu\text{m}$)



Fonte: Elaborada pelos autores.

Normalização com fator de resposta

A limitação do método de normalização tradicional pode ser minimizada aplicando-se um parâmetro denominado fator de resposta (F), o qual é usado para corrigir a variação da área do pico (ou altura) de interesse. O fator de resposta leva em conta a relação entre o valor da área do pico do composto padrão e a sua respectiva massa ou concentração, que é proporcional à porcentagem em massa. A correção da área do pico pelo fator de resposta (F) é obtida preparando-se e analisando-se uma solução de concentração conhecida do

composto padrão de interesse. Posteriormente, calcula-se o fator de resposta de acordo com a Equação 7.7.

$$F = \frac{C}{A} \quad (\text{Eq. 7.7})$$

Em que:

F = fator de resposta (de acordo com as unidades que C apresenta, os fatores obtidos apresentam a resposta do detector em termos das unidades mol/área ou mg/área etc.);

C = concentração ou massa do padrão;

A = área do pico do composto padrão.

Na prática, quando se efetua uma análise cromatográfica de amostras desconhecidas, as áreas dos picos de interesse do cromatograma são corrigidas multiplicando-as pelos respectivos fatores de respostas de cada soluto, de acordo com a Equação 7.8. Para uma melhor compreensão, considere uma análise cromatográfica representada pela mistura dos solutos A, B e C, os quais apresentam, respectivamente, fatores de correção F_a , F_b e F_c . A composição centesimal da amostra pode ser calculada usando a Equação 7.5, como mostrado no exemplo do cálculo de %A.

$$A(\%) = \left[\frac{AF_a}{(AF_a) + (BF_b) + (CF_c)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7.8})$$

Em que:

AF_a , BF_b e CF_c = áreas corrigidas.

A porcentagem em massa (ou concentração) de cada composto é obtida de acordo com a equação geral (Equação 7.9). Entretanto, esse método também assume que todos os picos são eluídos da coluna, logo, temos (LANÇAS, 2009):

$$AF_a + BF_b + CF_c = 100\% \quad (\text{Eq. 7.9})$$

O cromatograma da mistura equimolar dos álcoois, mostrado na Figura 7.10, também será utilizado para ilustrar os cálculos envolvendo a aplicação do fator de resposta na normalização da área, de acordo com os dados apresentados na Tabela 7.4, os quais foram obtidos de soluções de concentrações conhecidas (30mgL^{-1}) de metanol, etanol, propanol e butanol.

Após análise cromatográfica (das soluções dos álcoois), os fatores de resposta para cada soluto foram calculados usando a razão: concentração do padrão/área do pico do padrão (Equação 7.8). Na Tabela 7.4, são apresentados os dados experimentais, com os parâmetros calculados por normalização e normalização de área corrigida para a mistura equimolar de álcoois, e pode ser notado que os solutos apresentaram diferentes fatores de resposta.

Tabela 7.4 - Dados experimentais com os parâmetros calculados por normalização e normalização de área corrigida para a mistura equimolar de álcoois

| Analitos | C (mgL^{-1}) | Área do pico (cm^2) | Área normalizada (%) | Fator de resposta (C/Área) | Área corrigida (Ac) | Área normalizada com correção (%) |
|----------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---|
| Metanol | 30 | 577 | 13,94 | 0,0519 | 4,898 | $(4,898/19,928) \times 100$ = 24,58 |
| Etanol | 30 | 842 | 20,34 | 0,0356 | 4,987 | $(4,987/19,928) =$ 25,02 |
| Propanol | 30 | 1199 | 28,97 | 0,0250 | 5,006 | $(5,006/19,928) \times 100$ = 25,12 |
| Butanol | 30 | 1521 | 36,75 | 0,0197 | 5,037 | $(5,037/19,928) \times 100$ = 25,28 |
| Total | - | 4139 | 100 | - | 19,928 | 100 |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Também pode ser observado que, sem o uso do fator de resposta, obtém-se a composição centesimal (100%) composta de massas diferentes de cada soluto, sendo o butanol majoritário (36,75%). Por outro lado, quando se aplica o fator de resposta na determinação da composição centesimal, a contribuição da massa de cada soluto é equivalente a 25%, como era esperado para mistura equimolar contendo quatro solutos. No entanto, esse método também assume que todos os picos foram eluídos da coluna, logo, temos a Equação 7.10:

$$A + B + C = 100\% \quad (\text{Eq. 7.10})$$

Método do padrão externo

É um método simples e rápido, de aplicação universal (muitas vezes, erroneamente), que pode ser usado em diversas técnicas instrumentais. Esse método consiste em uma análise comparativa da resposta do analito na solução amostra com as respostas do padrão do analito. O procedimento analítico requer o preparo de soluções do padrão do analito em concentrações conhecidas e crescentes, com posterior análise cromatográfica de cada uma das soluções do padrão.

Uma solução do padrão externo é preparada separadamente da amostra e é utilizada para calibrar os instrumentos utilizados. A calibração é realizada obtendo-se o sinal de resposta como uma função da concentração conhecida do analito. Uma curva de calibração é construída com os dados colocados em forma de gráfico ou ajustados por meio de uma equação matemática adequada, do tipo da Equação 7.11, obtida pelo método dos mínimos quadrados (SKOOG et al., 2013).

Sendo assim, de posse dos dados cromatográficos (áreas ou altura dos picos), constrói-se uma curva analítica (de calibração) plotando-se as áreas obtidas dos picos versus as concentrações do padrão analítico. Desse modo, calcula-se a concentração do analito

na amostra utilizando-se o próprio gráfico ou a equação linear da reta (do tipo da Equação 7.11) que representa a curva analítica, como pode ser observado na Figura 7.11. Convém salientar que esse método de quantificação requer o uso de reagentes padrão extremamente puros e o conhecimento exato das concentrações das soluções, bem como dos volumes injetados no sistema cromatográfico e, por isso, não pode ser universalmente empregado.

$$y = ax + b \quad (\text{Eq. 7.11})$$

Em que:

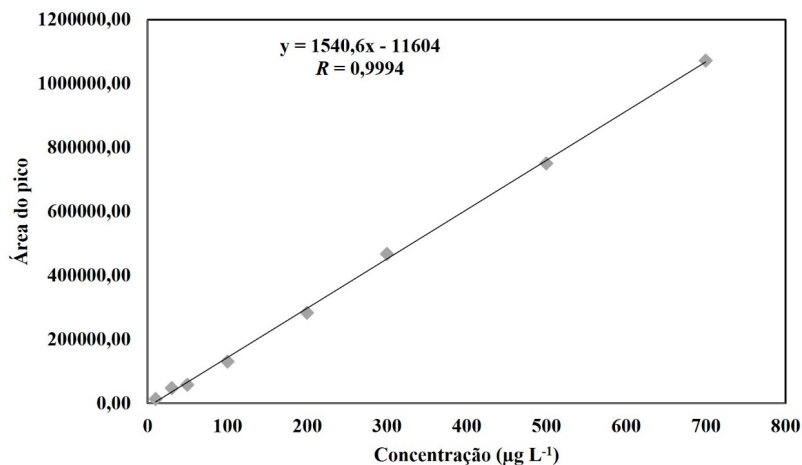
y = sinal analítico (área do pico);

a = coeficiente angular da reta;

x = concentração do analito;

b = coeficiente linear da reta.

Figura 7.11 - Típica curva analítica obtida por regressão linear usando o método do padrão externo



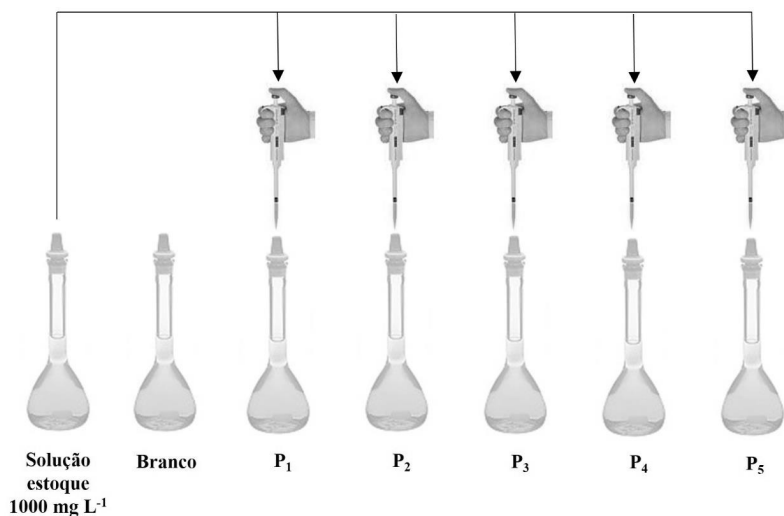
Fonte: Elaborada pelos autores.

A seguir, tem-se um exemplo da aplicação do método de padrão externo para a quantificação de um agrotóxico. Considerando que um analista tem o objetivo de determinar o agrotóxico trifloxistrobina em uma amostra de goiaba, utilizando um cromatógrafo gasoso; após realizada a análise qualitativa, confirma-se a presença do agrotóxico na amostra de goiaba. O próximo passo, então, é a análise quantitativa.

Visando a executar a análise quantitativa, inicialmente, o analista tem que preparar uma solução padrão concentrada contendo o referido agrotóxico. Essa solução concentrada é denominada de solução estoque (supondo que o analista utilizou uma mistura de solventes ciclohexano/acetato de etila 1:1, v/v). A partir da solução estoque concentrada, por meio de diluições, são preparadas as soluções padrão que serão utilizadas para construir a curva analítica, denominadas de soluções de trabalho.

O preparo das soluções de trabalho por diluição pode ser feito de dois modos distintos. No primeiro, as soluções de trabalho podem partir de uma única solução estoque, a partir da qual é preparado o padrão de maior concentração que compõe a curva analítica e, por meio de sucessivas diluições das soluções de trabalho, são preparados os demais padrões; no segundo, todas as soluções de trabalho que compõem a curva analítica são preparadas por diluições, partindo sempre da solução estoque (Figura 7.12). Este último modo é o mais recomendado, mas, dependendo da faixa de concentração, diluições diretamente da solução estoque podem envolver medições de volumes tão pequenos que o erro se torna grande (RIBANI et al., 2004).

Figura 7.12 - Procedimento de preparo das soluções de trabalho por meio de diluições a partir de alíquotas da solução estoque



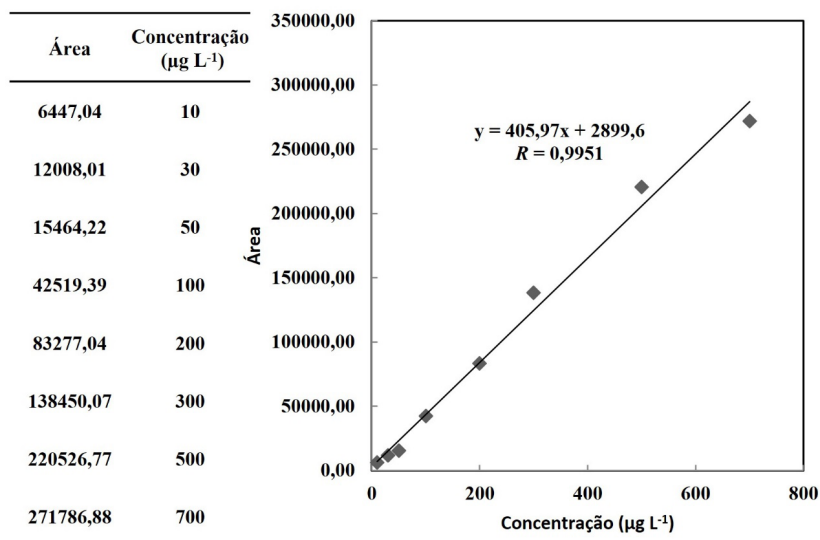
Fonte: Elaborada pelos autores.

Outro modo de preparar as soluções de trabalho seria pela medida da massa do padrão, de forma individual para cada concentração que compõe a curva analítica, em vez da utilização de diluições sucessivas de uma solução mais concentrada. Esta é a maneira ideal de preparar as soluções de trabalho, uma vez que a preparação individual mostra o erro verdadeiro na preparação de todas as soluções padrão e não erros de diluição. Entretanto, esse método torna-se inviável quando se trabalha com análise de traços, pois a quantidade de padrão a ser pesada é tão pequena que a sensibilidade da balança semimicroanalítica não permite tais pesagens, devido aos erros associados (RIBANI et al., 2004).

Retomando o exemplo da quantificação do agrotóxico trifloxistrobina em uma amostra de goiaba, uma vez preparadas as soluções de trabalho em diferentes níveis de concentração (0,01; 0,03; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50 e 0,70 $\mu\text{g L}^{-1}$), no caso do exemplo, em oito níveis de concentração, essas soluções analíticas são injetadas no sistema cromatográfico, e, a partir dos picos cromatográficos ge-

rados pela injeção das soluções de trabalho, é calculada a área do pico cromatográfico. Posteriormente, é construído um gráfico que relaciona a área com a quantidade do padrão analítico, como pode ser visto na Figura 7.13.

Figura 7.13 - Curva de calibração do agrotóxico trifloxistrobina construída por meio de padronização externa



Fonte: Elaborada pelos autores.

De modo geral, a partir da curva analítica, é obtida uma equação, conforme observado na Equação 7.1. Sabendo disso, o analista faz uso de um método de extração a fim de extrair o agrotóxico presente na matriz goiaba. Posteriormente, uma alíquota do extrato é injetada no sistema cromatográfico, gerando, assim, um sinal analítico. Em seguida, o analista executa o procedimento da análise qualitativa. Após confirmado que o pico apresentado no cromatograma da amostra é referente ao agrotóxico trifloxistrobina, segue-se a etapa de análise quantitativa. No exemplo, o analista calcula a área do pico referente ao agrotóxico na amostra, obtendo uma área média

de 63925,89. Substituindo o valor da área média na Equação 7.12, é possível mensurar a concentração do agrotóxico na amostra de goiaba. Assim sendo, a concentração do agrotóxico trifloxistrobina na amostra de goiaba é de $150,32\mu\text{gL}^{-1}$, que corresponde a $0,15\text{mgL}^{-1}$.

$$y = 405,97x + 2899,6 \quad (\text{Eq. 7.12})$$

É importante ressaltar que esse método de quantificação é sensível a erros de preparo da amostra, de preparo dos padrões analíticos e da injeção das soluções padrão e das amostras no sistema cromatográfico. Por isso, o método deve ser feito em cada análise (RIBANI et al., 2004). Além disso, é importante saber que, em uma análise quantitativa, o método de quantificação utilizado deve ter habilidade suficiente para determinar o analito de interesse sem a interferência de outros componentes presentes na amostra. Os interferentes presentes na amostra podem ocasionar efeito matriz (competição de matriz), que, por sua vez, pode proporcionar um incremento ou uma supressão do sinal analítico, interferindo, assim, diretamente na quantificação dos analitos presentes na amostra.

Nesse contexto, o método do padrão externo, apesar de ser extremamente simples e rápido, requer que a composição físico-química (matriz) da solução do padrão seja a mais próxima possível da solução amostra. Na prática, isso não é simples, sobretudo quando a composição total da amostra é muito complexa, o que torna o pareamento quase impossível de ser alcançado. Portanto, se o efeito matriz não for corrigido, a análise quantitativa por meio do método do padrão externo fica seriamente comprometida. Nesse caso, recomenda-se trabalhar com outros métodos de quantificação ou com a superposição de matriz, que é detalhada a seguir.

Método da superposição de matriz

No método de quantificação por superposição de matriz, o padrão do analito é adicionado em uma matriz similar à da amostra (extrato), isenta do analito de interesse. Sendo assim, são adicionadas diferentes quantidades de padrão de modo a preparar padrões analíticos em diferentes níveis de concentração. Posteriormente, os padrões analíticos são injetados no sistema cromatográfico, onde ocorre a aquisição dos dados necessários para a construção da curva de calibração, sendo, então, relacionadas as áreas obtidas com as concentrações dos padrões analíticos.

O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Esse método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância na quantificação quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

A principal vantagem do método de superposição de matriz sobre o método tradicional do padrão externo reside no fato de que, do ponto de vista analítico, a superposição de matriz fornece resultados mais confiáveis e representativos, haja vista que, na superposição de matriz, tem-se uma melhor equivalência com a composição da amostra. Esse fato é de extrema importância em cromatografia gasosa, uma vez que diversos compostos sofrem influência do efeito de matriz, promovendo, assim, quantificações errôneas, dado que o efeito de matriz pode causar um incremento ou uma supressão do sinal analítico. É observado ainda que o efeito de matriz é muito evidenciado em amostras complexas, tais como amostras de alimentos.

Por outro lado, o método de superposição de matriz tem a desvantagem de aumentar os custos e o tempo das análises. Além disso, apesar de se obter uma calibração mais confiável com o método de superposição da matriz, ele é somente uma forma para compensar possíveis efeitos causados por interferentes presentes na matriz da amostra. Outra desvantagem relevante é que, devido às ações climá-

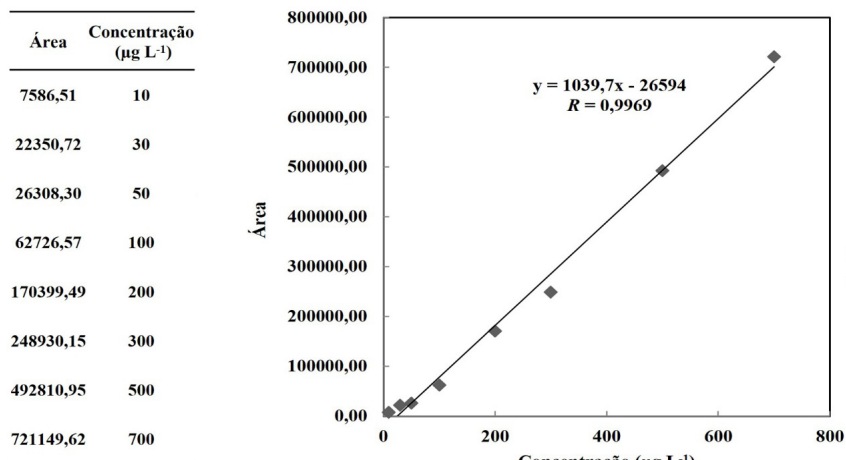
ticas e antrópicas, a composição de matrizes pode ser variável. Por exemplo, a composição de uma fruta produzida no sul do Brasil é diferente da composição de uma fruta produzida no nordeste do Brasil. Assim, não é possível assumir que diversos tipos de matrizes de goiaba proporcionem a mesma intensidade de efeito matriz. Outra desvantagem reside no fato de que nem sempre há disponibilidade de amostras isentas do analito de interesse. Desse modo, o método de superposição de matriz se torna inviável.

Retomando o exemplo dado no tópico de método do padrão externo, em que um analista tem o objetivo de quantificar o agrotóxico trifloxistrobina em uma amostra de goiaba. Suponhamos que o analista decide construir uma curva de calibração utilizando o método de superposição de padrão, objetivando, assim, avaliar as possíveis diferenças na quantificação pelos dois métodos de quantificação (padrão externo e superposição de matriz). Como foi visto, para construir uma curva de calibração por superposição de matriz, é necessária uma matriz isenta do analito de interesse. Em face disso, o analista adquire uma matriz de goiaba orgânica, ou seja, cujas plantações não fazem uso de agrotóxicos. Visando a obter um extrato para preparar as soluções analíticas que compõem a curva de calibração por superposição de padrão, o analista faz uso de um método de extração. Obtido o extrato da matriz goiaba (extrato isento de agrotóxicos), ele prossegue com o preparo das soluções analíticas.

O preparo das soluções padrão que compõem a curva analítica por superposição de matriz é similar ao da padronização externa, diferenciando apenas em um detalhe: no caso da superposição de matriz, são retiradas alíquotas da solução estoque, que são adicionadas aos balões volumétricos, os quais são aferidos com o extrato da matriz isenta de agrotóxicos. Posteriormente, as soluções padrão são injetadas no sistema cromatográfico, e é concebida a curva analítica tal como observada na Figura 7.14. Da curva analítica foi extraída a Equação 7.13, que a representa.

$$y = 1039,7x - 26594 \quad (\text{Eq. 7.13})$$

Figura 7.14 - Curva de calibração do agrotóxico trifloxistrobina, construída por meio de superposição de matriz



Fonte: Elaborada pelos autores.

Como foi mencionado no tópico de método do padrão externo, o analista faz uso de um método de extração para extrair o agrotóxico presente na matriz goiaba. Posteriormente, uma alíquota do extrato é injetada no cromatógrafo, gerando, assim, um pico cromatográfico referente ao agrotóxico trifloxistrobina, com uma área média de 63925,89. Substituindo o valor da área média na Equação 7.13, é possível mensurar a concentração do agrotóxico na amostra de goiaba pelo método da superposição de matriz. Sendo assim, a concentração do agrotóxico trifloxistrobina na amostra de goiaba é $87,06\mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde a $0,09\text{mg L}^{-1}$.

É possível observar uma diferença significativa entre os valores de concentração encontrados pelos dois métodos de quantificação. Dessa forma, quando calculamos a porcentagem do efeito matriz (cálculo concebido mediante uso da Equação 7.14), podemos ver que a sua intensidade é algo em torno de 156%. Essa diferença dos coeficientes angulares pode ser observada graficamente plotando-se as duas curvas, tal como apresentado na Figura 7.15.

Esse valor acentuado de efeito matriz indica que não é recomendado quantificar o analito pelo método da padronização externa, uma vez que o valor de efeito matriz se apresenta bem superior a 10%. Além disso, o valor positivo pode ser interpretado da seguinte forma: caso o analista execute a quantificação pelo método da padronização externa, será concebido um incremento no real valor da quantidade do agrotóxico presente na amostra, logo, teremos uma quantificação equivocada. Assim sendo, podemos concluir que, nos casos em que o efeito matriz se pronunciar de forma intensa, não é aconselhável quantificar o analito pelo método do padrão externo.

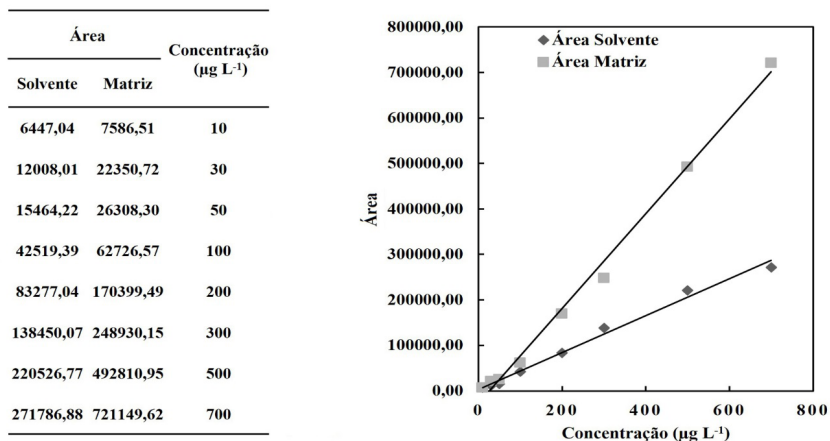
$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_2} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7.14})$$

Em que:

X_1 = coeficiente angular da curva obtida pela superposição de padrão;

X_2 = coeficiente angular da curva obtida pela padronização externa.

Figura 7.15 - Comparativo das curvas de calibração do agrotóxico trifloxistrobina, construídas pelos métodos do padrão externo e da superposição de matriz



Fonte: Elaborada pelos autores.

Método do padrão interno

Algumas das técnicas instrumentais de análise não geram resultados reprodutíveis, em particular a cromatografia gasosa. Nesta técnica, é quase impossível introduzir a mesma quantidade de massa do analito no sistema cromatográfico injetor/coluna (em análise com replicatas), e isso gera uma variação do sinal analítico medido (resposta do detector). A variação da resposta do detector se reflete na falta de reprodutibilidade acentuada na análise quantitativa do analito. Então, a fim de contornar esse inconveniente, o método do padrão interno é o mais empregado. Esse método consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância, chamada padrão interno, na amostra a ser analisada e relacionar as áreas obtidas do pico de interesse com a do padrão interno. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada e apresentar tempo de retenção próximo ao do analito de interesse. Na escolha do padrão interno, alguns fatores devem ser levados em conta, tais como:

- O padrão interno não deve fazer parte da composição química da amostra.
- Deve ser eluído em um tempo de retenção diferente dos outros constituintes da amostra. Porém, deve ser eluído próximo ao pico de interesse e ser bem resolvido em relação aos outros picos.
- Não deve reagir quimicamente com a amostra nem interferir de maneira nenhuma na amostra.
- Deve ser inerte quimicamente com o solvente e/ou gás de arraste que está sendo utilizado na análise.
- Deve ser disponível em alto grau de pureza.

A principal vantagem oferecida pelo método do padrão interno sobre os outros métodos de quantificação é a sua capacidade de prover resultados com maior exatidão e precisão (MONTORO, 1989). Na prática, esse método corrige erros ocorridos durante as análises, como variações no volume da amostra a ser injetada, variações na temperatura da coluna e da amostra etc.

Matematicamente, o método do padrão interno obedece a uma relação linear dada pela Equação 7.15.

$$y = mKC \quad (\text{Eq. 7.15})$$

Em que:

y = sinal analítico (área do pico);

m = termo constante relativo à resposta do detector;

K = parâmetro variável;

C = concentração do analito.

Considerando a análise de um dado composto de interesse (A) e do padrão interno (PI), temos as Equações 7.16 e 7.17.

$$y_A = m_A K_A C_A \quad (\text{Eq. 7.16})$$

$$y_{PI} = m_{PI} K_{PI} C_{PI} \quad (\text{Eq. 7.17})$$

Desde que as análises sejam realizadas na mesma solução amostra, então, podemos considerar que $K_A = K_{PI}$. Logo, a equação geral torna-se igual à Equação 7.18.

$$\frac{y_A}{y_{PI}} = \frac{C_A m_A}{C_{PI} m_{PI}} \quad (\text{Eq. 7.18})$$

A razão m_A/m_{PI} é denominada de fator de resposta (F). Posto que m_A e m_{PI} sejam constantes para uma dada condição experimental, então, o fator de resposta (F) também é constante. A equação fundamental do método do padrão interno é apresentada na Equação 7.19.

$$\frac{y_A}{y_{PI}} = F \left(\frac{C_A}{C_{PI}} \right) \quad (\text{Eq. 7.19})$$

Sendo,

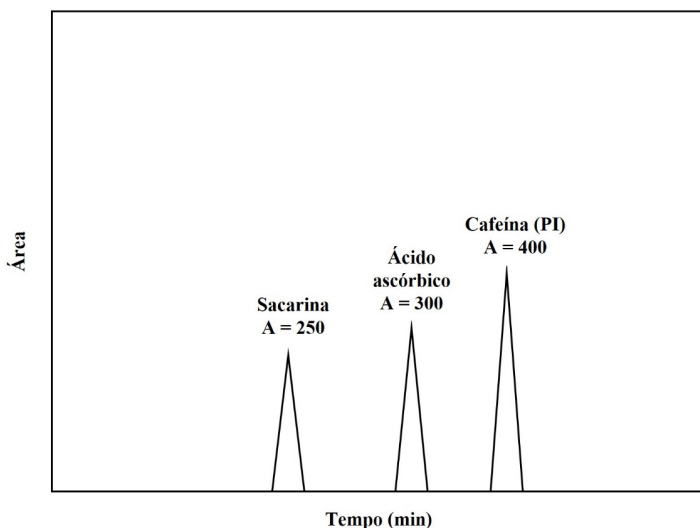
$$F = \frac{C_A}{C_{PI}} \quad (\text{Eq. 7.20})$$

A seguir, temos um exemplo genérico da aplicação do método de padrão interno: considerando um analista que tem a pretensão de quantificar o ácido ascórbico e a sacarina em uma amostra de refrigerante, utilizando a cafeína como padrão interno (PI) (MONTORO, 1989). De

posse de 100ml de uma solução padrão contendo os analitos (ácido ascórbico e sacarina) na concentração de 100mgL^{-1} , são adicionados a essa solução 10ml do PI na concentração de 200mgL^{-1} . Com isso, devemos atentar para o fato de que, com a adição do PI, temos uma pequena diluição dos padrões do analito e do próprio padrão interno, de modo que as concentrações dos padrões do analito e do PI passam a ser respectivamente de $90,91$ e $18,18\text{mgL}^{-1}$. Na Figura 7.16, temos a ilustração do cromatograma referente à análise cromatográfica dos padrões e do PI com os respectivos valores das áreas dos picos cromatográficos.

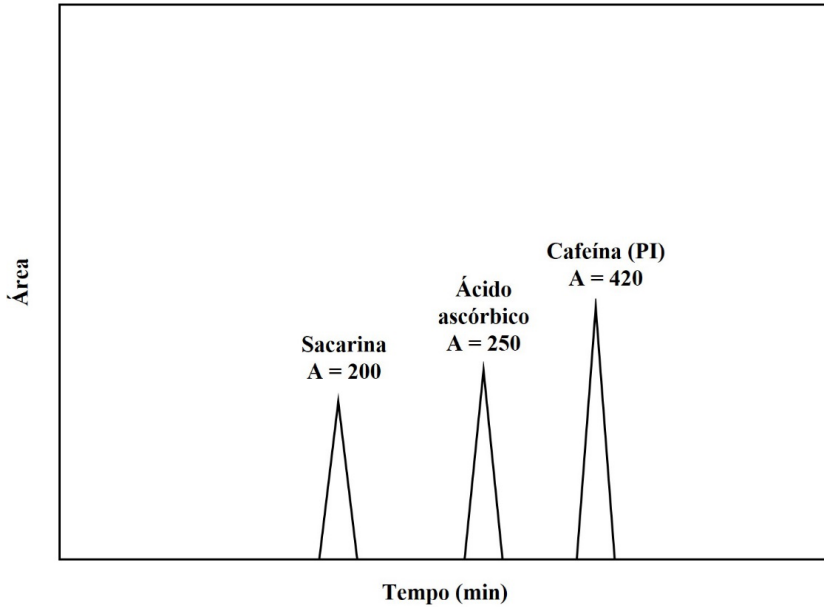
Posteriormente à análise e à obtenção do cromatograma com as respectivas áreas dos picos da mistura dos padrões analíticos com o padrão interno, prossegue-se com a análise da amostra de refrigerante. Para a análise da amostra, parte-se de 100ml de amostra e adiciona-se 10ml de PI na concentração de 200mgL^{-1} . Na Figura 7.17, podemos observar o cromatograma referente à análise da amostra, onde se encontram os picos cromatográficos dos padrões analíticos e do PI com as respectivas áreas.

Figura 7.16 - Cromatograma da mistura dos padrões dos analitos com o padrão interno, com as suas respectivas áreas



Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 7.17 - Cromatograma da análise da amostra dos analitos com o padrão interno, com suas respectivas áreas



Fonte: Elaborada pelos autores.

Uma vez que temos as áreas dos picos referentes aos padrões do analito e ao padrão interno e temos ainda as suas áreas na análise da amostra, prosseguimos, então, com o procedimento da quantificação. Verificando a Equação 7.19, observamos que, inicialmente, temos que calcular o fator de resposta (F) para os analitos. Para efetuar esse cálculo, utilizamos os dados referentes à mistura padrão. Desse modo, temos:

Para a sacarina,

$$\frac{y_{Sac}}{y_{PI}} = F \left(\frac{C_{Sac}}{C_{PI}} \right) \rightarrow \frac{250}{400} = F \left(\frac{90,91}{18,18} \right) \rightarrow F = 0,12$$

Para o ácido ascórbico,

$$\frac{y_{Ac}}{y_{PI}} = F \left(\frac{C_{Ac}}{C_{PI}} \right) \rightarrow \frac{300}{400} = F \left(\frac{90,91}{18,18} \right) \rightarrow F = 0,15$$

De posse dos cálculos do fator de resposta para os referidos analitos, dá-se sequência aos cálculos das concentrações dos analitos na amostra, tomando como base as áreas apresentadas na Figura 7.17 e os fatores de respostas previamente calculados. Sendo assim, novamente por meio da Equação 7.19, temos:

Para a sacarina,

$$\frac{y_{Sac}}{y_{PI}} = F \left(\frac{C_{Sac}}{C_{PI}} \right) \rightarrow \frac{200}{420} = 0,12 \left(\frac{C_{Sacc}}{18,18} \right) \rightarrow C_{Sac} = 72,14 \text{ mg L}^{-1}$$

Para o ácido ascórbico,

$$\frac{y_{Ac}}{y_{PI}} = F \left(\frac{C_{Ac}}{C_{PI}} \right) \rightarrow \frac{250}{420} = 0,15 \left(\frac{C_{Ac}}{18,18} \right) \rightarrow C_{Ac} = 72,14 \text{ mg L}^{-1}$$

É importante atentar para o fato de que, ao adicionar o PI na amostra, esta sofre uma diluição. Logo, sabendo que a 100ml de amostra foram adicionados 10ml de PI, temos que considerar, para expressar o resultado final, o fator de diluição (110ml/100ml). Assim, a concentração dos analitos na amostra é igual a 79,35mgL⁻¹.

Método do padrão interno múltiplo

O método consiste em preparar uma série de soluções contendo diferentes concentrações do analito padrão (C_A), em que também é adicionada a mesma quantidade conhecida do padrão interno (CPI). Posteriormente, as soluções são injetadas no cromatógrafo e, com os dados obtidos, é construída uma curva de calibração, na qual se relaciona a razão de áreas

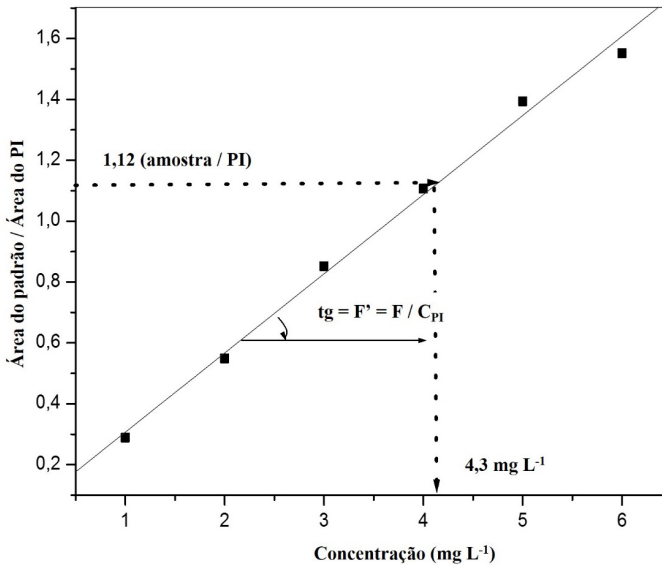
(área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração do analito. A equação empregada para múltiplos padrões é obtida a partir da Equação 7.20. Considerando a Equação 7.21, a Equação 7.19 pode ser reescrita apresentando-se tal como a Equação 7.22.

$$\frac{F}{C_{PI}} = F' \quad (\text{Eq. 7.21})$$

$$\frac{y_A}{y_{PI}} = F' C_A \quad (\text{Eq. 7.22})$$

Plotando-se um gráfico relacionando y_a/y_{PI} versus a concentração (C_A), obtém-se uma linha reta com coeficiente angular (ou tangente) igual a F' . Portanto, a concentração do analito pode ser determinada por interpolação, como ilustrado na Figura 7.18.

Figura 7.18 - Típica curva de calibração mostrando o procedimento de cálculo da concentração de um dado analito pelo método gráfico



Fonte: Elaborada pelos autores.

Sabendo que nem sempre é possível ou viável (quando se trabalha com um grande número de amostras) plotar um gráfico de calibração e determinar a concentração do analito por extrapolação, recomenda-se utilizar o método dos mínimos quadrados ordinários a fim de obter uma equação de regressão linear, como a Equação 7.12.

Para exemplificar esse procedimento: como já foi mencionado anteriormente, para construir uma curva de calibração por padronização interna, prepara-se uma série de soluções onde são adicionadas quantidades conhecidas e equivalentes dos padrões dos analitos e do padrão interno. Assim sendo, para preparar uma curva de calibração por padronização interna para dois hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), naftaleno e antraceno, foram preparadas soluções padrão multirresíduo (solução contendo os padrões dos analitos naftaleno e antraceno e o fluoranteno que foi utilizado como padrão interno) em oito níveis de concentração, de modo que em cada nível haja quantidades equivalentes dos padrões dos analitos e do padrão interno.

Uma vez que as soluções padrão foram preparadas, elas são injetadas no cromatógrafo para a aquisição dos dados necessários para a construção das curvas de calibração dos HPAs. Pelo cromatograma, são obtidas as áreas dos picos cromatográficos referentes aos analitos e ao padrão interno, conforme observado na Tabela 7.5. A curva de calibração por padronização interna relaciona a área do analito/área do padrão interno com as suas concentrações. Sabendo disso, calcula-se o fator de resposta (área do analito/área do padrão interno). Os resultados estão apresentados na Tabela 7.5.

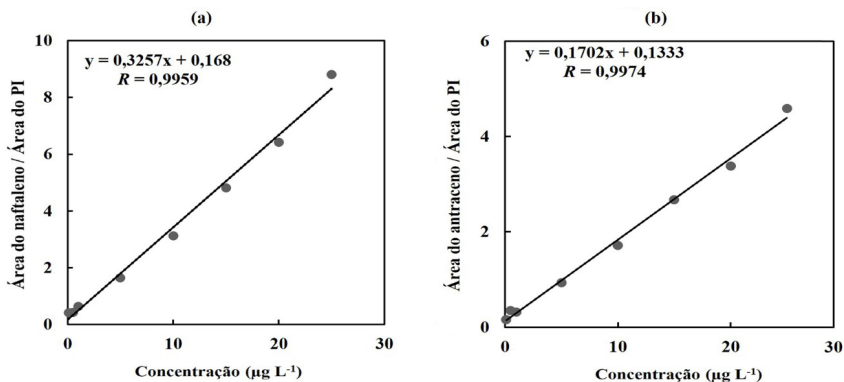
Tabela 7.5 - Dados experimentais obtidos dos analitos naftaleno e antraceno, usando fluoranteno como padrão interno

| C ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Área do Fluoranteno (PI) | Área do Naftaleno | Área do Antraceno | Área do Naftaleno / Área do PI | Área do Antraceno / Área do PI |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0,10 | 894,33 | 365,33 | 145,33 | 0,408498 | 0,162505 |
| 0,50 | 1108,33 | 482,33 | 387 | 0,435188 | 0,349173 |
| 1,00 | 1090,33 | 698,33 | 344 | 0,640477 | 0,3155 |
| 5,00 | 1253,33 | 2057,67 | 1172,33 | 1,641755 | 0,935372 |
| 10,00 | 991,33 | 3098 | 1698 | 3,125084 | 1,712845 |
| 15,00 | 1099,33 | 5299 | 2934,67 | 4,820194 | 2,669497 |
| 20,00 | 1065,33 | 6835,67 | 3599,67 | 6,416458 | 3,378911 |
| 25,00 | 935,33 | 8235,67 | 4286,67 | 8,805061 | 4,583036 |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tomando como base os dados apresentados na Tabela 7.5, podemos construir as curvas de calibração dos analitos naftaleno e antraceno (Figura 7.19). Por meio das curvas, são extraídas as equações das retas referentes aos analitos, as quais são utilizadas para quantificá-los.

Figura 7.19 - Curvas de calibração construídas por padronização interna referentes aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): (a) naftaleno e (b) antraceno



Fonte: Elaborada pelos autores.

Método da adição de padrão

Normalmente, o método das adições de padrão é utilizado quando há dificuldade ou impossibilidade de fazer uma cópia da matriz da amostra. De modo geral, a amostra é dopada com uma quantidade conhecida de uma solução padrão contendo o analito (SKOOG et al., 2013). Esse método é usualmente utilizado para eliminar o efeito matriz em análise de matrizes complexas, dado que o sinal analítico pode ser incrementado ou suprimido em função da complexidade da matriz da amostra. Consiste em preparar as soluções dos padrões com a própria solução da amostra. O procedimento envolve as etapas de:

- Preparação da amostra contendo o analito de interesse e medida do sinal analítico de interesse (área do pico, absorbância, potencial, corrente elétrica etc.).

- Adição dos padrões à amostra preparada (concentração e volume conhecidos) e análise do sinal analítico (curva de calibração).

No método das adições de padrão de um único ponto, duas porções da amostra são tomadas. Uma porção é medida como de costume, contudo uma quantidade conhecida da solução padrão é adicionada à segunda porção. As respostas para as duas porções são, então, empregadas para calcular a concentração desconhecida, assumindo-se uma relação linear entre a resposta e a concentração do analito.

O método de adição de padrão deve usado somente quando existe uma relação linear entre a resposta do detector (y) e a concentração do analito (C), de acordo com a Equação 7.23.

$$y = k[A] \quad (\text{Eq. 7.23})$$

Considerando uma solução amostra, na qual se pretende determinar a concentração de um dado analito ($[A]_i$), temos que a análise cromatográfica dessa solução fornece um sinal analítico (y_a). Posteriormente, é adicionada a uma alíquota da solução amostra uma concentração conhecida do padrão do analito ($[P]_i$), observando-se um sinal analítico (y_{ap}) referente à concentração do analito na amostra inicial mais a concentração do padrão adicionado. É importante observar que a adição de padrão na amostra, na qual a concentração do analito é desconhecida, promove uma alteração na concentração do analito, dado que proporciona uma diluição da amostra. Sendo assim, vamos considerar a concentração final (diluída) do analito como $[A]_f$ e a concentração final (diluída) do padrão como $[P]_f$. É importante salientar que as espécies químicas A e P são as mesmas (HARRIS, 2010).

Tomando como base a Equação 7.22, a concentração do analito é calculada aplicando-se a equação linear em duas condições, tal que a medida do sinal analítico (y) é obtida das análises das soluções amostra (Equação 7.24) e da solução amostra com a adição do padrão (Equação 7.25).

$$y_a = k[A]_i \quad (\text{Eq. 7.24})$$

$$y_{ap} = k([A]_f + [P]_f) \quad (\text{Eq. 7.25})$$

Em que:

$[A]_i$ = concentração do analito na amostra (sem adição de padrão);

$[A]_f$ = concentração do analito na amostra após a adição de padrão;

$[P]_f$ = concentração final do padrão adicionado na amostra;

y_a = sinal analítico referente ao analito;

y_{ap} = sinal analítico referente à mistura do analito com o padrão;

k = constante de proporcionalidade.

Sabendo que a constante de proporcionalidade (k) é a mesma para as Equações 7.24 e 7.25, podemos combinar as duas de modo a obter uma única equação para determinação da concentração do analito presente na amostra. O resultado da combinação é expresso na Equação 7.26:

$$[A]_i = \frac{y_a([A]_f + [P]_f)}{y_{ap}} \quad (\text{Eq. 7.26})$$

Como exemplo da aplicação do método de quantificação de adição de padrão de ponto único, tem-se que: considerando que a análise de uma amostra de urina por cromatografia gasosa, em que foi mensurada a área do pico, apresentou um sinal analítico (área do pico) referente à morfina de 250; posteriormente, 10ml de padrão analítico da morfina $0,50\text{mgL}^{-1}$ foram adicionadas a 40ml de urina; uma alíquota dessa solução foi injetada no sistema cromatográfico, sendo a área do pico da morfina de 900. Logo, podemos calcular a concentração de morfina na amostra de urina ($[A]_i$) por meio da

Equação 7.25. Sabemos que $y_a = 250$, $y_{ap} = 900$ e, para os valores de concentração $[A]_f$ e $[P]_f$, precisamos considerar os fatores de diluição. Assim, temos que $[A]_f$ e $[P]_f$ são calculados do seguinte modo:

$$[A]_f = [A]_i \left(\frac{V_{\text{amostra inicial}}}{V_{\text{total}}} \right) \rightarrow [A]_f = [A]_i \left(\frac{40}{50} \right) \rightarrow [A]_f = 0,8[A]_i$$

$$[P]_f = [P]_i \left(\frac{V_{\text{padrão adicionado}}}{V_{\text{total}}} \right) \rightarrow [P]_f = 0,50 \left(\frac{10}{50} \right) \rightarrow [P]_f = 0,10 \text{ mg L}^{-1}$$

De posse de todos os dados, calculamos a concentração de morfina na amostra de urina ($[A]_i$) a partir da Equação 7.25. Logo,

$$[A]_i = \frac{250(0,8[A]_i + 0,1)}{900} \rightarrow [A]_i = 0,03 \text{ mg L}^{-1}$$

Na prática, pode ser usado o método de adição de padrão com ponto único ou múltiplo. A vantagem do uso da adição de padrão com ponto único é a rapidez e a praticidade. Todavia, tem a desvantagem de não corrigir erros sistemáticos e erros indeterminados. Além disso, a presença de um interferente que se comporte de forma similar ao analito não é detectada e eliminada, com isso, a concentração do analito na amostra pode ser subestimada ou superestimada. Por outro lado, o uso do método de padrão múltiplo compensa as desvantagens citadas em relação à adição de padrão com uma única solução do padrão.

No método das adições múltiplas, são realizadas as adições de quantidades conhecidas da solução padrão do analito a várias porções da amostra, e uma curva de calibração com as múltiplas adições é concebida. O método das adições múltiplas permite verificar se existe uma relação linear entre a resposta e a concen-

tração do analito. De posse dos dados, pode-se utilizar o método gráfico ou matemático para determinar a concentração do analito em uma dada amostra (SKOOG et al., 2013).

No exemplo a seguir, tem-se a pretensão de quantificar um determinado analito em uma dada amostra complexa pelo método da adição de padrão múltiplo. Inicialmente, tem-se o preparo das soluções analíticas padrão que compõem a curva de calibração, considerando que se almeja preparar uma curva de calibração com cinco níveis de concentração. Primeiramente, são tomados 5 balões volumétricos de 50ml, nos quais são adicionados 5ml da amostra contendo o analito cuja concentração é desconhecida. Em seguida, são adicionadas quantidades crescentes do padrão analítico do analito (0, 5, 10, 15 e 20ml), 1mgL^{-1} , que se pretende determinar. Posteriormente, os balões são aferidos, conforme ilustrado na Figura 7.20 (HARRIS, 2010).

Tendo em vista que em cada balão volumétrico há a mesma quantidade de amostra, temos, então, a mesma concentração desconhecida do analito e concentrações diferentes do padrão do analito que foi adicionado, uma vez que foram adicionadas quantidades crescentes. Em seguida, as soluções analíticas são injetadas no cromatógrafo, de modo que o sinal analítico gerado em cada nível de concentração é oriundo da quantidade do padrão adicionado mais a quantidade do analito que se faz presente na amostra. Entretanto, no primeiro nível de calibração (branco), não é adicionado padrão do analito, conseqüentemente, o sinal analítico é referente apenas ao analito presente na amostra.

O cálculo da concentração de padrão analítico em cada balão após as diluições ($[P]_f$) é baseado nos volumes de padrão adicionados (V_{padc}), na concentração inicial do padrão ($[P]_i$) e no volume final de diluição ($V_{\text{balão}}$). Sendo assim, as concentrações podem ser calculadas pela Equação 7.27. Os resultados são apresentados na Tabela 7.5.

$$[P]_f = [P]_i \left(\frac{V_{padc}}{V_{bal\tilde{a}o}} \right) \quad (\text{Eq. 7.27})$$

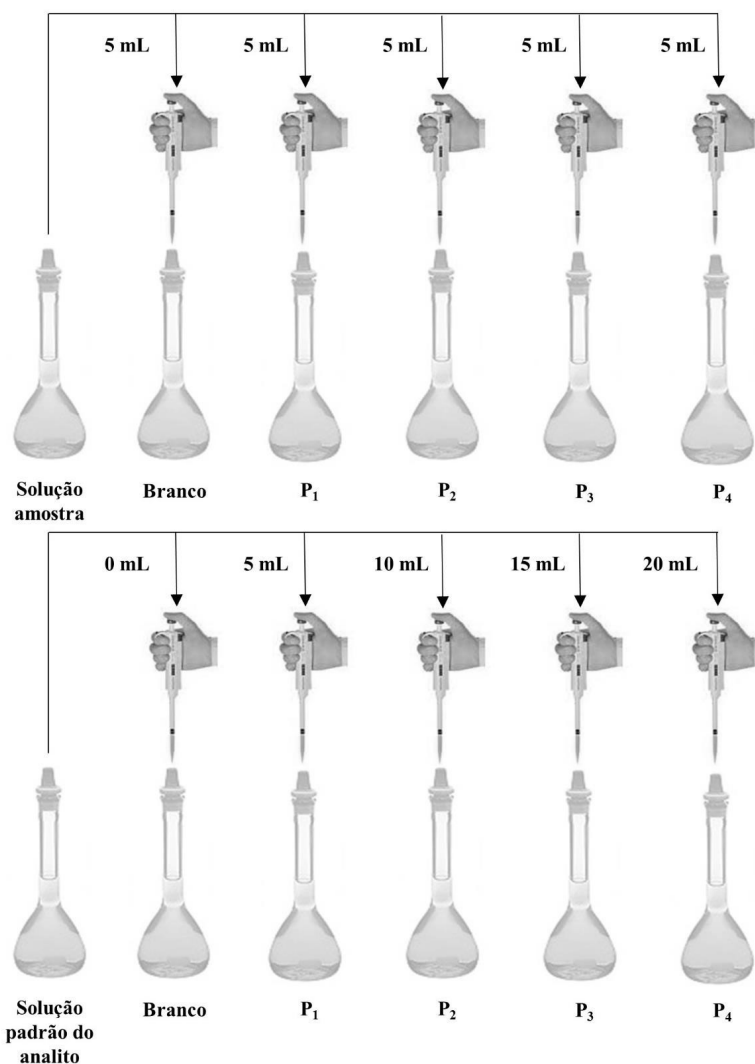
Sabendo disso, alíquotas das soluções padrão são injetadas no sistema cromatográfico. Em seguida, com a aquisição das áreas dos picos, plota-se um gráfico que relaciona o sinal analítico com as concentrações do padrão analítico que foram adicionadas. Na Tabela 7.6, são apresentados os resultados referentes à aquisição dos dados.

Tabela 7.6 - Dados e resultados necessários para a quantificação de um dado analito pelo método de quantificação de adição de padrão (método gráfico)

| Solução padrão | Volume de padrão do analito adicionado (V_{padc}), mL | Concentração do padrão adicionado no balão ($[P]_i$) | Área dos picos |
|-----------------------|---|--|-----------------------|
| P ₁ | 0 | 0 | 247 |
| P ₂ | 5 | 0,1 | 540 |
| P ₃ | 10 | 0,2 | 900 |
| P ₄ | 15 | 0,3 | 1313 |
| P ₅ | 20 | 0,4 | 1750 |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 7.20 - Ilustração do procedimento de preparo das soluções padrão com adição de padrão, visando a construir uma curva de calibração

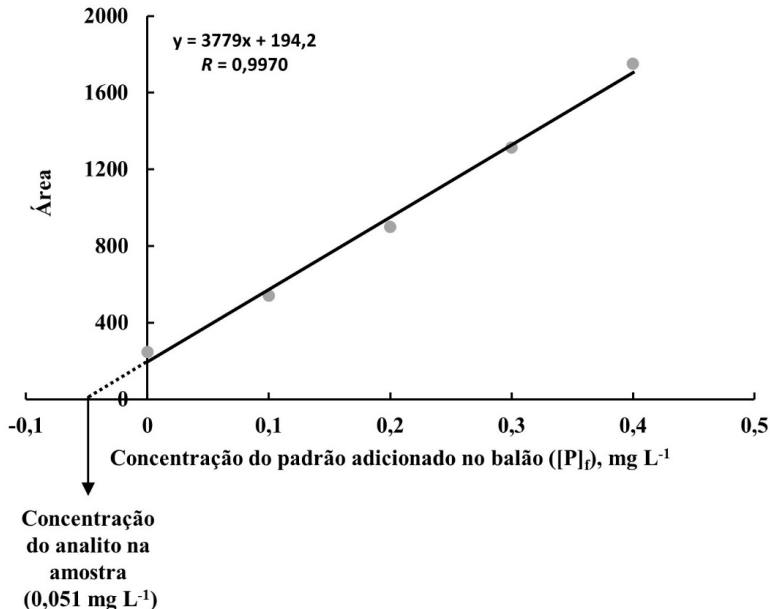


Fonte: Elaborada pelos autores.

Fundamentando-se nos dados apresentados na Tabela 7.6, podemos construir um gráfico relacionando a concentração do padrão adicionado no balão e a área dos picos, como ilustrado na Figura 7.21. Tendo em vista que a concentração do analito na amostra é numericamente igual ao coeficiente angular da reta, podemos determiná-la graficamente extrapolando a linha de tendência. Desse modo, tem-se que a concentração do analito é igual a $0,051 \text{ mg L}^{-1}$. Entretanto, temos que considerar a diluição sofrida pela amostra, em que 5ml foram diluídos para 50ml. Logo, o cálculo da concentração do analito na amostra (C_{amostra}) é:

$$C_{\text{amostra}} = 0,051 \left(\frac{50}{5} \right) = 0,51 \text{ mg L}^{-1}$$

Figura 7.21 - Gráfico empregado no cálculo da concentração do analito pelo método gráfico da extrapolação da reta



Outra maneira de calcular a concentração do analito na amostra é pelo método matemático, usando a equação do tipo da Equação 7.28 e construindo um gráfico que relaciona Δy ($\Delta y = y_{ap} - y_a$) versus C_p (concentração do padrão), sendo a concentração do analito calculada pela tangente da reta (Equação 7.29). A Tabela 7.7 exibe os dados necessários para a confecção do gráfico (Figura 7.22).

$$\Delta y = \left(\frac{y_{amostra}}{C_{amostra}} \right) C_p \quad (\text{Eq. 7.28})$$

$$tg = \frac{y_{amostra}}{C_{amostra}} \quad (\text{Eq. 7.29})$$

Tabela 7.7 - Dados e resultados necessários para a quantificação de um dado analito pelo método de quantificação de adição de padrão (método matemático)

| Concentração do padrão adicionado no balão ($[P]_p$) | Área dos picos | $\Delta y = y_{ap} - y_a$ |
|--|----------------|---------------------------|
| 0 | 247 | 0 |
| 0,1 | 540 | 293 |
| 0,2 | 900 | 653 |
| 0,3 | 1313 | 1066 |
| 0,4 | 1750 | 1503 |

Fonte: Elaborada pelos autores.

A partir da Figura 7.22, podemos obter os dados necessários para calcular a tangente. Sabendo que a tangente é igual à razão de $\Delta y/\Delta x$, tem-se:

$$tg = \frac{1066}{0,3} = 3553,33$$

Assim, a partir da Equação 7.28, podemos calcular a concentração do analito na amostra, tal como:

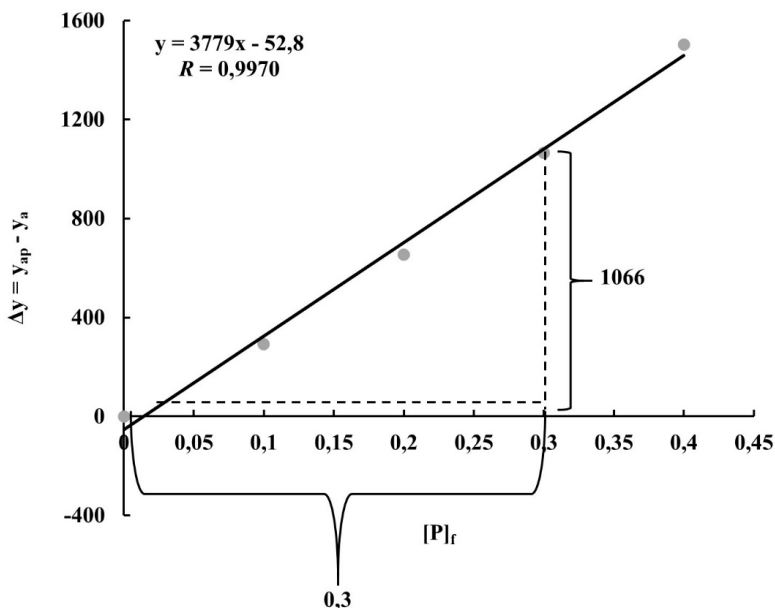
$$C_{amostra} = \frac{247}{3553,33} = 0,069 \text{ mg L}^{-1}$$

Contudo, considerando a diluição sofrida pela amostra, onde 5ml foram diluídos para 50ml, logo, o cálculo da concentração do analito na amostra ($C_{amostra}$) é:

$$C_{amostra} = 0,069 \left(\frac{50}{5} \right) = 0,69 \text{ mg L}^{-1}$$

Quando calculamos a concentração do analito na amostra pelos métodos gráfico e matemático, observamos diferenças entre os valores de quantificação do analito. Esse fato pode estar associado às aproximações realizadas na concepção dos cálculos.

Figura 7.22 - Gráfico utilizado para o cálculo da concentração do analito pelo método matemático



Fonte: Elaborada pelos autores.

Análise comparativa dos diferentes métodos de quantificação

A fim de ilustrar a aplicação dos métodos de quantificação, tem-se, a seguir, um exemplo comparativo entre os métodos de quantificação padrão externo, padrão interno e normalização.

Considerando a Tabela 7.8, onde são apresentados os dados referentes à quantificação de metanol, etanol, propanol e butanol. Em uma análise quantitativa, é muito comum os analistas interpretarem os resultados fornecidos pelo método da normalização como um parâmetro quantitativo válido e ainda aceitarem os resultados obtidos por calibração externa. A comparação dos resultados quantitativos, empregando os diferentes métodos apresentados na Tabela 7.8, indica distorções muito sérias no perfil quantitativo dos álcoois. Observando

os resultados do método da normalização, por exemplo, vê-se que o teor percentual de butanol é maior que o do metanol, entretanto, comparando com os valores obtidos pelo método do padrão interno, verifica-se o inverso (Tabela 7.8). O erro maior está em relação ao método da normalização, em que se adota que todos os compostos apresentam respostas similares em relação ao detector de chama (FID) (FURTADO, 2003).

Analisando os valores de desvio padrão relativo (Tabela 7.7) dos diferentes métodos de quantificação, é perceptível uma diferença significativa quando comparamos os dados apresentados para os métodos de padrão externo e padrão interno. Além disso, ao fazer uma comparação dos valores de desvio padrão relativo dos métodos do padrão interno e normalização, também vemos valores muito diferentes. Tal fato indica que, em uma análise quantitativa por cromatografia gasosa, o uso do método de quantificação do padrão interno apresenta resultados bem mais reprodutíveis, tendo em vista que os valores de DPR são inferiores a 10%, enquanto os métodos de quantificação por padronização externa e por normalização apresentam DPRs superiores a 20%.

Tabela 7.8 - Resultados da quantificação das amostras utilizando diferentes métodos de quantificação: padrão externo, padrão interno e normalização

| Compostos | Padrão externo (mg L⁻¹) ± DPR % | Padrão interno (mg L⁻¹) ± DPR % | Normalização % ± DPR |
|------------------|---|---|---------------------------------|
| Metanol | 29,48 ± 20,90 | 45,5 ± 6,70 | 10,44 ± 22,16 |
| Etanol | 67,14 ± 21,95 | 111 ± 5,77 | 38,00 ± 23,63 |
| Propanol | 31,37 ± 21,78 | 48,6 ± 3,45 | 22,81 ± 26,15 |
| Butanol | 29,11 ± 23,58 | 43,8 ± 5,01 | 28,75 ± 31,18 |

Fonte: Adaptada de Furtado (2003).

Média de 6 determinações (n=6)

Referências bibliográficas

- CASTELLO, G. Retention index systems: alternatives to the n-alkanes as calibration standards. *Journal of Chromatography A*, v. 842, p. 51-64, 1999.
- CIOLA, R. *Introdução à cromatografia em fase gasosa*. São Paulo: Edgar Blücher, 1973.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2006.
- DETTMER-WILDE, K.; ENGEWALD, W. *Practical gas chromatography: a comprehensive reference*. Berlin: Springer, 2014.
- DYSON, N. *Chromatographic integration methods*. 2. ed. Cornwall: The Royal Society of Chemistry, 1998.
- FURTADO, A. O. *Cromatografia gasosa de alta resolução: teoria cromatográfica e análise quantitativa*. 2003. 40 f. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- GIRARD, B. Retention index calculation using Kováts constant model for linear temperature-programmed gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 721, p. 279-288, 1996.
- GÖRGÉNYI, M.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H. Temperature dependence of the Kováts retention index: the entropy index. *Journal of Chromatography A*, v. 1137, p. 84-90, 2006.
- GROB, R. L.; BARRY, E. F. *Modern practice of gas chromatography*. 4. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.
- HARANGI, J. Retention index calculation without n-alkanes - the virtual carbon number. *Journal of Chromatography A*, v. 993, p. 187-195, 2003.
- HARRIS, D. C. *Quantitative chemical analysis*. 8. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, v. 41, n. 7, p. 1915-1932, 1958.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas: Átomo, 2009.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. *Basic gas chromatography*. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

MEYER, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5. ed. John Wiley & Sons, 2010.

MONTORO, E. R. *Apostila de técnicas matemáticas aplicadas à química analítica*. São Luís: UFMA, 1989.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SHIMADZU CORPORATION. 2007a. Disponível em: <http://www.shimadzu.com/an/retention_index.html>. Acesso em: 25 set. 2015.

SHIMADZU CORPORATION. 2007b. Disponível em: <http://www.shimadzu.com/an/retention_index.html>. Acesso em: 27 set. 2015.

SHIMADZU CORPORATION. 2007c. Disponível em: <<https://shimadzu.com.au/databases-retention-indices-support-analysis>>. Acesso em: 28 set. 2015.

SILVA, D. D. et al. Avaliação da seletividade de uma nova coluna capilar em cromatografia gasosa - teste de Grob e índice de retenção. *Revista Analytica*, n. 17, p. 40-47, 2005.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentals of analytical chemistry*. 9. ed. Belmont: Brooks/Cole/Cengage Learning, 2013.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 11, p. 463-471, 1963.

VON MÜHLEN, C. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 3, p. 21-29, 2009.

OS AUTORES

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Possui graduação em Química Industrial pela Universidade Federal do Maranhão (1991) e doutorado em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos - USP (1997). Atualmente é professor titular do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará. Tem experiência na área de Química, com ênfase em separação (métodos cromatográficos), química ambiental (análise de traços), adsorção (tratamento de efluente usando biopolímeros de baixo custo).

Ari Clecius Alves de Lima

Possui graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará (2003) e mestrado em Engenharia Civil (Recursos Hídricos) pela Universidade Federal do Ceará (2009). Tem experiência em Recursos Hídricos, com ênfase em saneamento ambiental, atuando principalmente nos seguintes temas: tratamento de água e esgoto por adsorção e eletroflotação, análise de regressão linear e não linear, delineamento de experimentos em esquema fatorial, análise multivariada e análise por cromatografia gasosa.

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

Possui mestrado em Química, na área de concentração de Química Analítica, pela Universidade Federal do Ceará (2013), sendo graduado em Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (2009). Tem experiência na área de Química, com ênfase em Química Analítica, atuando principalmente na linha de pesquisa de desenvolvimento de métodos analíticos, com ênfase em métodos cromatográficos, especialmente em GC/MS e HPLC-DAD, técnicas de preparo de amostras para determinação de compostos orgânicos (QuEChERS, microextração em fase sólida - SPME, extração em fase sólida - SPE, extração líquido-líquido - ELL) e validação de métodos analíticos. Durante a graduação, atuou na área de análise de água e efluentes, trabalhando, após a graduação, na área de biocombustíveis, com ênfase em biodiesel, produção e controle de qualidade.

Vítor Paulo Andrade da Silva

Possui graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Ceará (2010) e mestrado em Química, com área de concentração em Química Analítica, pela Universidade Federal do Ceará (2013). Atualmente é aluno de doutorado em Química, com área de concentração em Química Analítica, pela Universidade Federal do Ceará, e trabalha com desenvolvimento de métodos para análise de pesticidas em matrizes ambientais. Tem experiência com cromatografia gasosa (GC-FID e GC-MS) e microextração em fase sólida (SPME).



Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará – UFC
Av. da Universidade, 2932 – fundos – Benfica
Fone: (85) 3366.7485 / 7486
CEP: 60020-181 – Fortaleza – Ceará
imprensa.ufc@pradm.ufc.br

A Universidade Federal do Ceará contribui por excelência para a educação e para a ciência em nosso país. Como um dos seus avanços acadêmicos, merece destaque o desenvolvimento da pós-graduação, que fortalece o pilar da formação de recursos humanos por meio da pesquisa.

A pós-graduação brasileira, sistematicamente avaliada nas últimas décadas, ganha credibilidade, e seus pesquisadores gozam de reconhecimento internacional. Nesse processo, o livro integra a produção intelectual acadêmica das múltiplas áreas que compõem o quadro científico da Universidade e apura os esforços dos pesquisadores que veiculam parte de sua produção nesse formato.

A Coleção de Estudos da Pós-Graduação foi criada, portanto, para apoiar os programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFC e consolidar uma política acadêmica, científica e institucional de valorização da pesquisa, ao franquear o curso da produção intelectual em forma de livro.

