

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA – ESCOLA DE ENGENHARIA
BACHARELADO EM ENGENHARIA FÍSICA

MÓDULOS PARA DETECÇÃO EM SÉRIE
PARA EQUIPAMENTOS DE HPLC

por

Samuel Hartmann

Orientado por Prof. Dr. Tarso Ledur Kist

Porto Alegre – RS

Janeiro de 2017

SAMUEL HARTMANN

MÓDULOS PARA DETECÇÃO EM SÉRIE
PARA EQUIPAMENTOS DE HPLC

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Física

Orientador: Prof. Dr. Tarso Ledur Kist

Porto Alegre – RS

Janeiro de 2017

Sumário	
Sumário	3
Resumo	i
Lista de Figuras	ii
1. Introdução	1
2. Objetivos e Metas	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1 Princípios da técnica de cromatografia a líquido	4
3.2 Princípios de detecção aplicados à cromatografia a líquido	6
3.2.1 Características gerais dos detectores utilizados em técnicas cromatográficas	10
3.2.2 Aquisição e processamento de dados	14
4. Instrumentação do sistema de detecção	15
4.1 Instrumentação do detector baseado em fluorescência	17
4.2 Instrumentação do detector baseado em espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis	23
5. Caracterização do sistema de detecção/Validação do Método	27
5.1 Flutuações na linha de base do cromatograma	28
5.2 Identificação dos picos	29
5.3 Calibração	32
5.4 Cálculo do Limite de Detecção (LOD)	33
6. Resultados e Discussão	36
7. Sugestões para trabalhos futuros	37
8. Bibliografia	38
Anexo A	39

Resumo

Neste trabalho de Diplomação em Engenharia Física, é apresentado um projeto de instrumentação de detectores baseados em espectrofotometria por fluorescência e por absorção molecular em UV-Vis, para aplicações em equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O sistema desenvolvido foi projetado para operação em série dos dois detectores, possibilitando a sua operação em simultâneo ou individualmente, expandindo as possibilidades de investigação do equipamento.

O detector baseado em fluorescência foi desenvolvido utilizando um LASER com comprimento de onda de 405 nm e potência média de 10 mW, enquanto o detector por absorção foi desenvolvido utilizando-se uma fonte de LED com espectro de emissão centrado em 435 nm.

Ambos os detectores foram construídos sobre uma mesma plataforma instalada imediatamente na saída de um equipamento comercial de HPLC, e foram projetados de tal forma a ter seus componentes substituídos facilmente. Isso confere grande grau de liberdade para as análises a serem feitas com estes detectores.

Amostras com componentes padrão de ácidos carboxílicos foram analisadas pelo detector de fluorescência. Os resultados indicam uma ótima linearidade para a faixa de concentrações entre 28 nM e 450 nM; intensidade de ruído satisfatória para as análises; e ótimo limite de detecção, sendo dez vezes superior ao detector utilizado anteriormente no laboratório¹.

Palavras-chave: HPLC, Detector de fluorescência, Detector de Absorção, detecção em série.

¹ Testes sob mesmas condições de preparação de amostra, operação do equipamento e detecção para ácido linolênico derivatizado em MPAC-Br.

Lista de Figuras

Figura 1 - Expansão do (a) número de publicações e (b) receita da venda de equipamentos de HPLC desde 1966. Adaptado de [1].	6
Figura 2 - Diagrama básico de um equipamento de HPLC. O solvente (a) é bombeado (b) de forma a diluir a amostra (c), que será aplicada na coluna cromatográfica (d). Idealmente, o detector (e) é posicionado imediatamente após a coluna, e o sinal correspondente é adquirido, processado e armazenado (f). Adaptado de [1].	7
Figura 3 - Relação sinal/ruído (S/N)	13
Figura 5 - Equipamento de HPLC do Laboratório de Métodos, modelo 525 System da Biotech.	16
Figura 6 - Fixação do conector metálico da saída do equipamento de HPLC com a plataforma dos detectores.	16
Figura 7 - Peças usadas como molde para montar os detectores.	16
Figura 8 - Diagrama básico de um detector baseado em fluorescência.	17
Figura 10 - Fixação da lente plano-convexo imediatamente na saída do feixe do LASER.	21
Figura 11 - Remoção do revestimento do capilar criando a janela de detecção.	21
Figura 12 - Posicionamento da janela de detecção no centro do detector.	21
Figura 13 - Alinhamento do LASER com o centro do capilar. A região sombreada refere-se ao capilar.	21
Figura 14 - Reflexões internas do LASER no capilar. Necessidade de usar filtros.	21
Figura 16 - Gráfico da temperatura na parte traseira do diodo do LASER em função do tempo de operação contínuo - sem sistema de refrigeração (azul), e com sistema de refrigeração (laranja).	22
Figura 17 - Diagrama básico do detector baseado em espectrofotometria de absorção.	23
Figura 18 - Vista frontal e superior do detector.	24
Figura 19 - Posicionamento de duas lâminas espaçadas por aproximadamente 400 μm .	26
Figura 20 - Usinagem em ângulo da peça para posicionamento do LED.	26
Figura 21 - Vista lateral do detector. Na esquerda pode ser visto o LED, e na direita os dois fotodiodos OPT101.	26
Figura 22 - Posicionamento do capilar sobre a parte inferior do detector.	26
Figura 23 - Estrutura do detector com o LED ligado.	26
Figura 25 - Medição do ruído do detector. Foi utilizado um intervalo de aproximadamente 8 minutos.	25
	29
Figura 26 - Picos individuais do cromatograma de amostras de padrões de ácidos carboxílicos derivatizados.	31
Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.	27
Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.	27
Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.	27
Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.	27
Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.	27
Figura 28 - Reação de derivatização entre MPAC-Br e ácidos carboxílicos.	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tabela com as áreas correspondentes às 5 medidas e para 5 concentrações diferentes de ácido esteárico.....	32
Tabela 2 - Cálculo do limite de detecção baseado na curva de calibração do detector.....	34
Tabela 3 - Nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química dos ácidos carboxílicos estudados neste trabalho.....	39

1. Introdução

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (abreviação *HPLC*, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), é uma técnica de cromatografia a líquido desenvolvida e em uso desde os anos 1970, sendo um resultado de diversos avanços científicos e tecnológicos ocorridos durante o século XX. Através desta técnica é possível identificar, separar, purificar, e proceder análises quantitativas de praticamente todos os compostos que possam ser solubilizados em meio líquido. Equipamentos de HPLC estão em uso em diversos laboratórios de pesquisa e análises, e indústrias ao redor de todo o mundo, com aplicações em diversas áreas do conhecimento. Equipamentos modernos consistem de um sistema integrado de injeção de amostras, disponibilidade de diferentes tipos de colunas, fases estacionárias e móveis, além de diversos sistemas de detecção agindo de forma complementar e integrada [1].

Este trabalho de Diplomação em Engenharia Física tem como foco sistemas de detecção utilizados em equipamentos de HPLC. Será abordada a teoria básica dos sistemas de detecção encontrados nestes equipamentos, metodologias de caracterização, e as etapas da montagem dos detectores desenvolvidos neste trabalho. Em seguida, serão apresentadas as medidas de caracterização do desempenho dos detectores, seguidas de uma análise dos resultados e perspectivas futuras relacionadas ao projeto.

Dentre estes diversos sistemas de detecção disponíveis comercialmente, incluem-se detectores baseados em espectrofotometria por fluorescência, espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis, índice de refração, medida de condutividade elétrica, entre outros [2]. Neste trabalho, será apresentada uma metodologia simples para o desenvolvimento de detectores baseados em espectrofotometria de fluorescência e de absorção em UV-Vis, a serem utilizados individualmente ou simultaneamente em um equipamento comercial de HPLC em uso no Laboratório de Métodos do Instituto de Biociências da UFRGS. Todo o processo, desde o desenho das peças, usinagem, alocação de componentes, testes e medidas com amostras do laboratório serão descritas de forma sequencial e da forma mais didática possível.

Este trabalho de diplomação engloba conhecimentos de diversas disciplinas cursadas durante o curso de Engenharia Física, dentre as quais merecem destaque:

[QUI01121] – Química Fundamental e [QUI02014] – Química Orgânica: Formulação e equacionamento químicos; nomenclatura; cinética e equilíbrio químicos; estrutura e reatividade de compostos orgânicos;

[FIS01008] – Eletrônica Básica: Instrumentos de medição de características elétricas de circuitos; montagens e caracterização de circuitos elétricos;

[FIS01235] – Propriedades físicas dos materiais: Descrição e relações entre propriedades mecânicas, térmicas, elétricas, magnéticas e ópticas dos materiais;

[QUI03002] – Espectroscopia: Espectroscopias rotacional, vibracional e eletrônica;

[FIS01234] – Instrumentação Física: Metrologia; interface com software;

[FIS01239] – Fotônica: Geração e propagação de feixes LASER; projeto e análise de sistemas ópticos; detectores de radiação;

2. Objetivos e Metas

Este trabalho tem por objetivo construir os detectores ópticos para equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que sejam robustos e apresentem a performance desejada para os materiais de interesse do Laboratório de Métodos da UFRGS. Estes detectores devem ser utilizados de forma individual ou simultânea na saída de um equipamento comercial instalado neste laboratório.

Para atender este objetivo, será feita a instrumentação de detectores baseados em espectrofotometria de fluorescência com a utilização de um LASER com comprimento de onda centrado em 405 nm; e outro detector baseado em absorção na região do UV-Vis. Estes detectores serão posicionados em uma plataforma específica onde haverá espaço para a adição de outros detectores que porventura sejam adquiridos pelo laboratório. As peças para os detectores serão desenhadas e usinadas nas estruturas dos laboratórios da UFRGS, sempre que possível, e utilizando componentes mecânicos e eletrônicos já disponíveis ou de baixo custo de aquisição. Em um primeiro momento, estes detectores serão utilizados na identificação e quantificação de misturas de ácidos carboxílicos, que fazem parte do estudo de um mestrando do laboratório.

Em uma primeira etapa, os detectores serão caracterizados de forma a avaliar suas características de linearidade, flutuações na linha de base do cromatograma e limites de detecção para diversos ácidos carboxílicos cujos padrões estão disponíveis no laboratório e atualmente estão em estudo pelo grupo de pesquisa do laboratório. Dentre estes ácidos carboxílicos estão: ácido decanoico, ácido tridecanoico, ácido linolênico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, e ácido cáprico.

Os principais desafios encontrados na instrumentação dos equipamentos, bem como a recomendação de trabalhos a serem feitos no futuro serão indicados neste trabalho.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Princípios da técnica de cromatografia a líquido

A cromatografia a líquido é uma técnica em uso desde os primórdios de 1900, quando o botânico russo Tswett separou pigmentos de folhas utilizando uma coluna aberta de vidro preenchida com carbonato de cálcio e alumina, adsorventes sólidos chamados então de *fase estacionária*. A amostra era então aplicada no topo da coluna sob fluxo do solvente, chamado de *fase móvel*, que sob a ação da gravidade deslocava-se continuamente pelo adsorvente arrastando os pigmentos. Devido a interações diferenciadas entre os pigmentos com a fase estacionária, esses tinham diferentes velocidades de migração. Baseado nisso, Tswett conseguiu visualizar bandas coloridas correspondentes a diferentes pigmentos, apelidando a técnica de *cromatografia* [3]. Mais tarde, a técnica viria a ser chamada de Cromatografia Líquida Clássica (CLC), englobando as técnicas cromatográficas feitas em coluna de vidro e sob pressão atmosférica. Nos anos seguintes ao experimento de Tswett, diversas amostras pigmentadas foram separadas através da técnica de CLC, possibilitando identificar visualmente a separação ocorrida através da passagem destes pelo adsorvente. Pequenas quantidades do solvente eram coletadas na saída da coluna de vidro, e diferentes técnicas eram empregadas a fim de investigar quantitativamente as amostras em estudo, incluindo-se análise gravimétrica, algumas técnicas ópticas, e evaporação do solvente. Como desvantagens, normalmente se descartava a coluna após cada análise, e não havia muita automatização do processo.

Passadas algumas décadas, surgiu em meados dos anos 1940 a técnica de cromatografia ascendente chamada de Cromatografia de Papel. Nesta técnica, uma tira de papel é colocada em contato com a amostra, e em seguida esta mesma ponta do papel é imersa em solvente. Por ação da capilaridade, o solvente migra em direção ascendente e devido às interações diferenciadas dos componentes da amostra com o papel, esses migram em diferentes velocidades possibilitando sua separação. Poucos anos depois, a substituição da tira de papel por revestimentos de superfícies de vidro com sílica em pó deu nome à técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) [4].

Muitos outros avanços sucederam os trabalhos iniciais em cromatografia líquida – como por exemplo: colunas recheadas, empacotadas em pressão mais elevada, e diminuição do

tamanho das partículas da fase estacionária (de **1,1** μm a **10** μm). Sumariamente, estas melhorias tornaram possível ampliar o poder de separação dos diferentes componentes das amostras e a eficiência dos equipamentos, ao custo de ter de utilizar bombas mais potentes a fim de fazer com que a fase móvel tenha pressão suficiente para atravessar as colunas empacotadas. No início da década de 1970 utilizavam-se bombas com capacidade de 35 bar, o que foi suficiente para apelidar a técnica de “*High-Pressure Liquid Chromatography*”, abreviadamente HPLC. Com a introdução de diferentes tipos de colunas empacotadas, bombas mais potentes e novos métodos de detecção e processamento de dados, o termo HPLC passou a referir-se à “*High-Performance Liquid Chromatography*”, termo em uso até os dias atuais.

Nos equipamentos modernos de HPLC, a amostra é aplicada automaticamente na coluna, enquanto o solvente é continuamente injetado na coluna que contém a fase adsorvente. Diversos tipos de detectores podem ser utilizados para converter a concentração ou a massa de um analito em um sinal de corrente ou tensão, que será posteriormente digitalizado, processado e armazenado em um sistema de dados. O gráfico da intensidade destes sinais elétricos em função do tempo de migração de uma amostra pelo sistema do HPLC é chamado de *cromatograma*. Atualmente, os equipamentos de HPLC são controlado por software, e as colunas são reaproveitáveis, tornando a técnica robusta, além de possuir boa reprodutibilidade intra-laboratorial e inter-laboratorial.

A técnica de HPLC tornou-se uma das mais poderosas quanto a capacidade de separação, identificação e quantificação de compostos químicos. Seu sucesso pode ser visto através dos números de publicações relacionadas a HPLC e número de vendas de equipamentos de HPLC por ano, desde a sua invenção (Figura 1). Enquanto o número de publicações anuais estabilizou-se por volta de 1990, as vendas de equipamentos continuam a crescer, devido ao seu forte emprego na indústria farmacêutica, de cosméticos, alimentos, testes de doping, perícias, identificação e quantificação em amostras biológicas, dentre diversas outras.

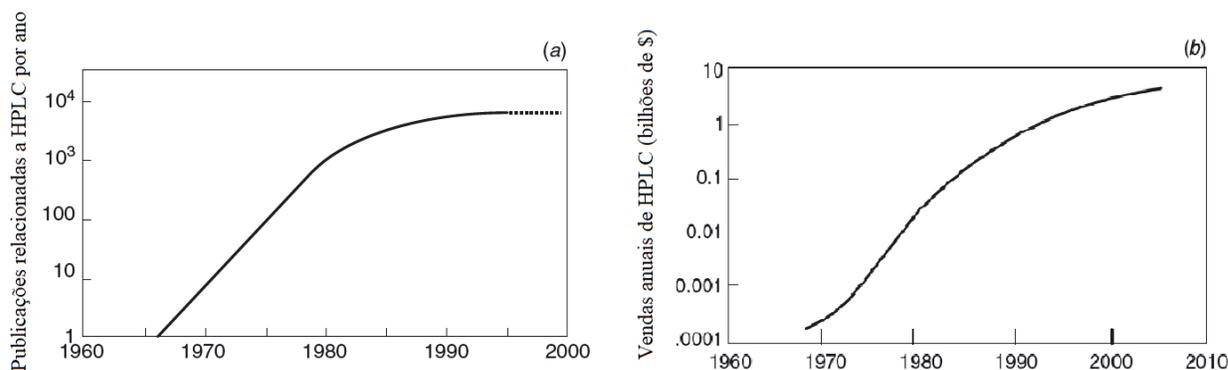


Figura 1 - Expansão do (a) número de publicações e (b) receita da venda de equipamentos de HPLC desde 1966. Adaptado de [1].

Mais recentemente, no ano de 2004, foi apresentado um novo equipamento de cromatografia líquida utilizando colunas com partículas adsorventes de diâmetro inferior a 1,7 μm e bombas com capacidade superior a 1000 bar. Este importante avanço deu origem a uma nova nomenclatura para a técnica, agora chamada de *Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência*, ou UPLC .

Sendo este um mercado bastante complexo e abrangente em relação às técnicas disponíveis, é comum subdividi-lo em diferentes categorias de equipamentos. Dentre estes, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa, e cromatografia em camada delgada. Equipamentos de HPLC são os dispositivos cromatográficos mais utilizados, esperando-se que ultrapassem 70% de fatia de mercado neste ano de 2018 [5].

3.2 Princípios de detecção aplicados à cromatografia a líquido

Um detector utilizado em equipamentos de cromatografia a líquido deve ser capaz de identificar pequenas variações na composição da fase móvel na saída da coluna cromatográfica, gerando um sinal de corrente ou tensão elétrica que será posteriormente processado e interpretado por um analista experiente. Idealmente, este detector tem uma resposta rápida e proporcional à quantidade de soluto em análise, possui baixo volume morto, apresenta resultados reprodutíveis e é pouco influenciado pela temperatura do sistema. Quando se trata de amostras biológicas, é desejável também que o detector seja não destrutivo para que possa haver coleta de frações, seja robusto, sensível, seletivo e de fácil manipulação. Evidentemente, tais especificações não serão

atendidas por um único tipo de detector, sendo necessário escolher entre os diversos métodos de detecção aquele que melhor atende aos requisitos da análise.

Geralmente os detectores são posicionados imediatamente após a saída da coluna do HPLC, a fim de evitar que a dispersão do analito cause alargamento nos picos do cromatograma correspondente. Um diagrama bastante comum de equipamentos de HPLC é apresentado na Figura 2.

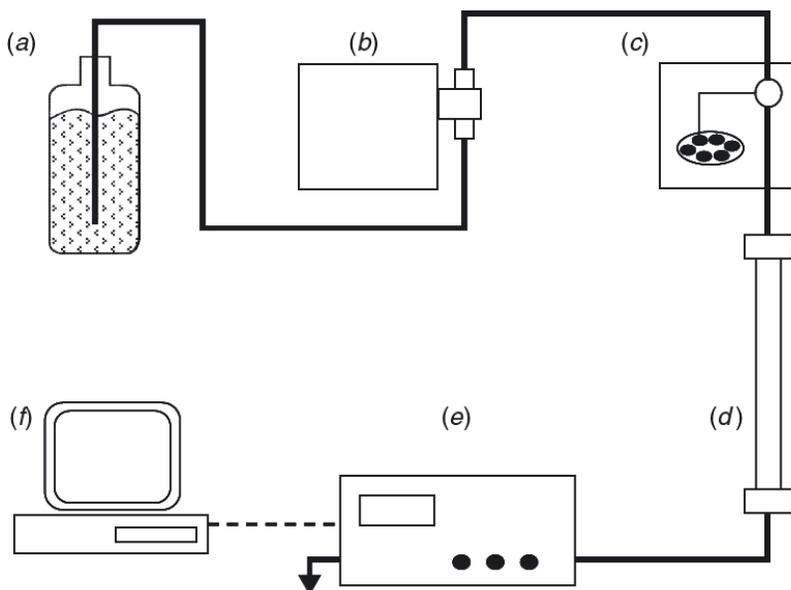


Figura 2 - Diagrama básico de um equipamento de HPLC. O solvente (a) é bombeado (b) de forma a diluir a amostra (c), que será aplicada na coluna cromatográfica (d). Idealmente, o detector (e) é posicionado imediatamente após a coluna, e o sinal correspondente é adquirido, processado e armazenado (f). Adaptado de [1].

Detectores baseados em espectrofotometria por fluorescência

Detectores de fluorescência modernos possuem uma sensibilidade que pode chegar na ordem de pg-fg, cerca de 100-1000 vezes superior aos detectores de absorção, com um intervalo linear dinâmico que pode ultrapassar magnitudes de 10^5 . Devido a isso, muitas vezes estes detectores são utilizados para a análise de componentes traço em uma amostra. Um pré-requisito para os analitos a serem estudados com este tipo de detector é de que estes fluoresçam – seja naturalmente ou através de reações com moléculas derivatizantes. Neste último caso, agentes derivatizantes modificam quimicamente um composto inicialmente não-excitável, *derivatizando*

seu grupo funcional (por exemplo, -OH, COOH, N-H, e S-H). Se este composto sofre este tipo de derivatização, poderá ser possível excitá-lo de forma a passar pelo processo de fluorescência.

No processo de detecção, moléculas do soluto emitem luz em um comprimento de onda característico após absorverem uma luz incidente com radiação de maior energia. Em equipamentos comerciais, utilizam-se como fontes de luz lâmpadas de deutério ou xenônio, por terem um espectro de emissão amplo, ou mesmos LASERs – neste caso, a técnica recebe o nome de Fluorescência Induzida por LASER (mais comumente conhecida pela sigla em inglês: LIF).

A luz emitida pelo analito é filtrada e tem sua intensidade medida por um fotodetector, que a converte em sinal de corrente elétrica e este é digitalizado para processamento e análise dos dados.

Detecção baseada em espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis

Detecção de absorção na região do ultravioleta e visível são atualmente os mais utilizados em cromatografia a líquido. O princípio básico por trás do funcionamento deste tipo de detector está na relação entre concentração de um analito em um certo volume e a respectiva quantidade de luz absorvida, expressa pela Lei de Beer-Lambert por:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon cd \quad \text{[Equação 1]}$$

Onde I_0 é a intensidade da luz incidente na célula de detecção, I é a intensidade de luz transmitida, ϵ é o coeficiente de absorção molar decádico da amostra, d é o comprimento do caminho óptico na janela de detecção, c é a concentração da amostra em mol/L. O termo A refere-se à absorbância, e em geral estes detectores são projetados para operar em uma região linear de absorbância com a concentração do analito em estudo. Atualmente, detectores comerciais baseados em absorção no UV-Visível são capazes de operar com uma intensidade de ruído menor do que 10^{-5} Unidades de Absorção (UA) em um intervalo linear superior à duas unidades de absorbância, com limites de quantificação de poucos nanogramas [6].

Este tipo de detector pode operar com limites de detecção na ordem de ng - pg, sendo bem menos influenciado por variações de temperatura e composição da fase móvel se comparado aos detectores de fluorescência. A absorção de luz por moléculas no intervalo entre 190 e 700 nm depende das características das moléculas é normalmente em forma de bandas. Detectores de absorção podem ser fixados para absorção em um intervalo estreito (~0,2 nm) de comprimentos

de onda ou também numa faixa mais larga (~50 nm), este último apresentando em geral melhores limites de detecção. É ainda essencial que a fase móvel seja transparente opticamente ao comprimento de onda da luz utilizada, ou que sua absorbância seja conhecida e descontada da absorbância medida, que neste caso será a soma das absorbâncias da fase móvel e da fase estacionária.

Existem três tipos de detectores baseados em absorção UV-Vis: detectores com comprimento de onda de trabalho fixo, podendo utilizar tanto fontes monocromáticas quanto policromáticas com filtros para seleção de comprimentos de onda específicos; detectores com comprimento de onda de trabalho variável; e detectores de arranjo de diodos.

Detectores baseados em índice de refração

Este é o tipo mais antigo de detecção para cromatografia líquida. Frequentemente usado de forma complementar à detecção por absorção, é uma técnica não-selectiva de detecção pois mede uma característica da célula de detecção como um todo. Tipicamente a luz de uma lâmpadas de tungstênio é direcionada para duas células diferentes: uma de referência, contendo somente a fase móvel pura, e outra com a amostra em análise. Desvios no índice de refração entre as duas células são detectados com uma sensibilidade bastante inferior à detecção por absorção UV, chegando a ser 1000 vezes menor. Além disso, este tipo de detecção exige um bom controle de temperatura e da pressão do bombeamento de amostras para a coluna cromatográfica.

Detectores baseados em condutividade elétrica

Este tipo de detector mede a condutividade do material em separação, sendo esta proporcional à concentração iônica na amostra. Seu intervalo linear é modesto, e quanto maior a condutividade da amostra, menor a sensibilidade de detecção, tendo em vista que a condutividade é altamente dependente da temperatura. Detectores de condutividade mais modernos possuem compensação automática de variações de temperatura e supressão de ruídos devido à eletrônica. São detectores de custo relativamente baixo e bastante usados para detecção de íons inorgânicos e ácidos orgânicos.

Outros detectores

Ainda há outros tipos de detectores amplamente utilizados em equipamentos de HPLC, dentre os quais merecem destaque detectores eletroquímicos, detectores de radioatividade, detectores de quimiluminescência eletroinduzida, detector de espalhamento de luz e o acoplamento a espectrômetros de massa.

3.2.1 Características gerais dos detectores utilizados em técnicas cromatográficas

Diversos esforços para a normatização e formação de protocolos que assegurem a validação de detectores e métodos analíticos foram discutidos nas últimas décadas. Órgãos de cooperação internacional têm trabalhado para a elaboração de diretrizes e metodologias para a validação de métodos analíticos – incluindo-se aí a definição e metodologias de avaliação de diversas características comuns a detectores dos mais variados tipos, e que devem ser levadas em consideração durante a elaboração de um projeto de instrumentação de detectores.

Duas grandes organizações, que têm suas diretrizes para validação de métodos analíticos respeitadas internacionalmente, são a *International Conference on Harmonization (ICH)* e a *Health Canada (HC)*. Originalmente voltada para a normatização de requerimentos técnicos para o registro de produtos em diferentes mercados internacionais, a ICH lançou suas primeiras recomendações em 1995, através do documento intitulado “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*” [7]. Estas recomendações foram logo adotadas por órgãos importantes como a *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* e *United States Pharmacopeia (USP)*. Posteriormente, em 1996, a ICH lançou normativas atualizadas especificamente para a indústria [8], que foram adotadas por grandes mercados regionais incluindo os Estados Unidos da América, União Europeia e Japão. As recomendações da *Health Canada*, intituladas de “*Acceptable Methods Guidance*” [9], são complementares às normativas da ICH, abrangendo algumas áreas não cobertas por esta. Além disso, a HC fornece modelos de documentos para sumarizar o processo de validação dos métodos analíticos – utilizados como referência para o presente trabalho.

Os atributos que devem ser levados em conta segundo as diretrizes da ICH e da HC, seguidos de suas definições e metodologias de validação, são apresentados a seguir.

Seletividade

O termo seletividade vem da capacidade de identificar inequivocamente um analito, mesmo que na presença de outros componentes (como por exemplo, a própria matriz, impurezas, materiais de degradação, entre outros). A seletividade é muito importante para garantir a identidade de um certo analito ou do conteúdo de impurezas em uma amostra.

Linearidade do sistema

Tipicamente, a intensidade de sinal de um detector é proporcional à quantidade de soluto na janela de detecção, em um dado instante. Isso é verdade apenas dentro do chamado intervalo linear de detecção.

Exatidão

A exatidão expressa o quão próximo da realidade uma medição está indicando, seja esta convencionalmente aceita como verdadeira ou obtida através de um valor padrão conhecido.

Precisão

A precisão indica o grau de proximidade entre si de uma série de medidas em sequência e feitas sob as mesmas condições. É um resultado que independe da exatidão, geralmente expresso por meio da variância ou do desvio padrão. Dentre as diversas maneiras de se avaliar a precisão de um método analítico, é comum calcular a precisão tendo como base medidas de um mesmo equipamento durante intervalos de tempo curtos e longos, e entre equipamentos usados em diferentes locais e por diferentes pessoas.

Intervalo de operação

O intervalo de operação de um instrumento analítico é definido como o intervalo de concentrações em ele opera com precisão, exatidão e de forma linear com a concentração – e, desta forma, depende destas e outras variáveis.

Limite de detecção

O limite de detecção (abreviação "LOD", do inglês *Limit of Detection*), geralmente é definido como sendo a quantidade mínima de soluto necessária para formar um pico suficientemente grande de forma a ser distinguível do ruído de fundo. Essa quantidade mínima não necessariamente pode ser quantificada, e é, portanto, uma medida qualitativa do desempenho do equipamento [10].

Há basicamente quatro maneiras diferentes de se determinar o limite de detecção de um instrumento: visualmente, pela razão sinal-ruído do pico de menor concentração; pelo desvio padrão relativo (“RSD”) e coeficiente angular da reta de calibração; e por definição de um critério para o desvio padrão relativo.

Na determinação do LOD *visualmente*, é estabelecida uma concentração mínima de um certo analito a fim de se identificar um pico. Esse método é subjetivo, e portanto deve ser evitado para fins de documentação de um instrumento analítico.

O segundo método estabelece um valor mínimo para a razão sinal-ruído (S/N). Diferentes valores podem ser utilizados, mas em geral valores de S/N maiores do que 3 unidades são aceitos como um bom indicativo do limite de detecção.. A Figura 3 exemplifica como é feita a medida da relação entre sinal e ruído de um pico. O ruído refere-se às flutuações da linha base, mesmo quando nenhum analito está passando pela janela de detecção.

No método de cálculo a partir do desvio padrão relativo e inclinação da reta de calibração, a seguinte relação é utilizada para o cálculo:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S'} \quad \text{[Equação 2]}$$

Onde σ é o desvio padrão da série de medidas realizadas com diferentes concentrações, e S' é o coeficiente angular da reta de calibração. Para diminuir a incerteza na determinação do valor do LOD, é necessário que múltiplas medidas sejam feitas à uma concentração próxima do valor esperado para o LOD. Em geral, de 5 a 6 medidas em sequência são suficientes.

O último método está baseado na relação entre o LOD e o desvio padrão relativo, dado por:

$$\% RSD = \frac{50}{S/N} \quad \text{[Equação 3]}$$

Tendo em vista de valores de S/N de 3 unidades são considerados suficientes para distinguir um pico de um analito, neste método a concentração mínima para obter um desvio padrão relativo de ~17% é obtido.

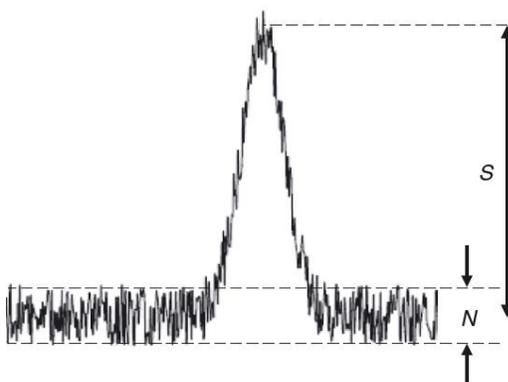


Figura 3 - Relação sinal/ruído (S/N)

Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (“LLOQ”) é a quantidade mínima de soluto em uma amostra que pode ser quantificado pelo sistema de detecção, obedecendo aos critérios de precisão. Uma relação S/N de pelo menos 10 unidades é usualmente utilizada para que um pico possa servir de base para quantificação da amostra. Porém, em sistemas de alta precisão este valor de S/N pode ultrapassar 50 unidades.

Outros dois métodos similares aos utilizados na determinação do limite de detecção podem ser utilizados na determinação do LLOQ: através do desvio padrão relativo e coeficiente angular da reta de calibração; e por definição de um critério para o desvio padrão relativo. No primeiro caso, a relação muda ligeiramente com relação ao LOD:

$$LLOQ = \frac{10\sigma}{S'} \quad \text{[Equação 4]}$$

Onde σ é o desvio padrão da série de medidas realizadas com diferentes concentrações e S' é o coeficiente angular da reta de calibração.

No método baseado na relação entre o LLOQ e o desvio padrão relativo, consideram-se quantificáveis as concentrações de analito que gerarem um S/N de pelo menos 10 unidades.

Robustez

A robustez de um instrumento analítico está relacionada à sua capacidade de ser pouco afetado por pequenas variações de parâmetros de operação. É indicado que a robustez seja

avaliada já num estágio avançado de desenvolvimento do equipamento, ou mesmo durante a validação de novos métodos analíticos.

Estabilidade da linha de base

Existem três categorias distintas de ruídos de detecção. Ruídos de alta frequência, geralmente causados pelo sistema de aquisição e mal aterramento, podem ser identificados por rápidas variações do sinal base e de pequena intensidade. Este tipo de ruído pode ser mais facilmente filtrado e não chega a ser um grande problema em medidas por cromatografia líquida. Ruídos de baixa frequência, por sua vez, podem ser confundidos com os próprios picos gerados pela passagem do soluto, e podem comprometer bastante a sensibilidade do detector. “Drifts” (“derivadas”) entram na terceira categoria de ruído, geralmente causados por variações de temperatura, vazão e composição do solvente. Na prática, o ruído de um detector será uma combinação de todos os três tipos de ruído, conforme pode ser visto na Figura 4.

Geralmente a origem deste ruído deve-se a variações de temperatura e pressão dentro da coluna e da taxa de vazão da solução, além de flutuações na potência do LASER, e quanto maior a intensidade deste ruído da linha de base, menor será o limite de detecção do instrumento[11].

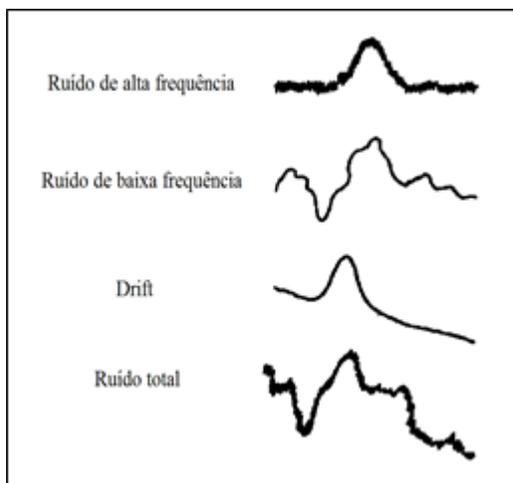


Figura 4 – Principais tipos de ruídos em um sistema de detecção. Adaptado de [12].

O ruído dos detectores construídos neste trabalho devem ser avaliados

3.2.2 Aquisição e processamento de dados

O sinal elétrico de saída de um detector, seja analógico ou já digitalizado, deve ser coletado, armazenado e processado para a interpretação do analista. O sistema de aquisição tipicamente

envolve uma placa de aquisição de dados, que recebe um sinal analógico/digital do detector e se comunica com um computador onde os dados serão armazenados, processados e projetados para interpretação de um analista. Tanto o detector quanto a placa de aquisição são responsáveis pelo tempo de resposta do sistema de aquisição, sendo fundamental que a placa de aquisição tenha um bom desempenho no intervalo de aquisição desejado.

O processamento de dados envolve a conversão do sinal digitalizado em picos gaussianos, que são convertidos em um cromatograma, de fácil leitura por um analista, e pode também envolver algoritmos mais avançados de filtragem de ruído, seleção de canais de diferentes detectores, identificação de picos cromatográficos, dentre outras automatizações possíveis.

4. Instrumentação do sistema de detecção

Neste capítulo são apresentados os métodos e instrumentos utilizados para a realização de cada uma das etapas do projeto apresentadas como metas.

O equipamento de HPLC em utilização no Laboratório de Métodos é um Biotech modelo 525 System (Hallertau, Alemanha), mostrado na Figura 5. Na saída da coluna do equipamento, foi adaptado um conector metálico que conecta a coluna a um capilar com diâmetro externo de 435 μm e interno de 320 μm , por onde os analitos são transportados até a região onde são fixados os detectores. Os detectores são fixados em sequência e sobre uma plataforma rígida e estável, e será possível escolher por operar no modo de detecção individual ou simultânea – com mais de um sistema de detecção conjuntamente. Na Figura 6 é mostrada a junção do conector da saída do HPLC com o capilar, e a plataforma onde serão instalados os detectores. O conector foi fixado à plataforma, e esta foi coberta com um envoltório acrílico a fim de deixar o sistema menos suscetível a vibrações, choques mecânicos e eventuais quedas de objetos sobre a plataforma.

De forma a desenvolver um detector robusto, estável, de fácil usinagem e troca de componentes descomplicada, foi escolhido usinar peças do suporte em material poliamida 6.6/6 na cor preta. Estas peças molde foram usinadas em formato cilíndrico, conforme mostrado na Figura 7. Optou-se por fazer uma usinagem cilíndrica nessas peças devido à grande facilidade em usinar suportes em ângulos específicos para os componentes ópticos (LASERs, LEDs, filtros, entre outros) que serão acoplados aos suportes.



Figura 5 - Equipamento de HPLC do Laboratório de Métodos, modelo 525 System da Biotech.

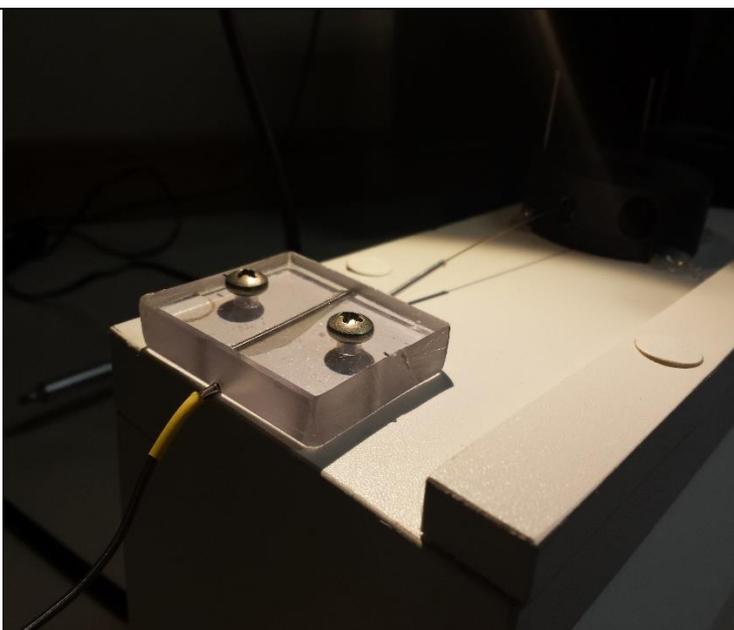


Figura 6 - Fixação do conector metálico da saída do equipamento de HPLC com a plataforma dos detectores.

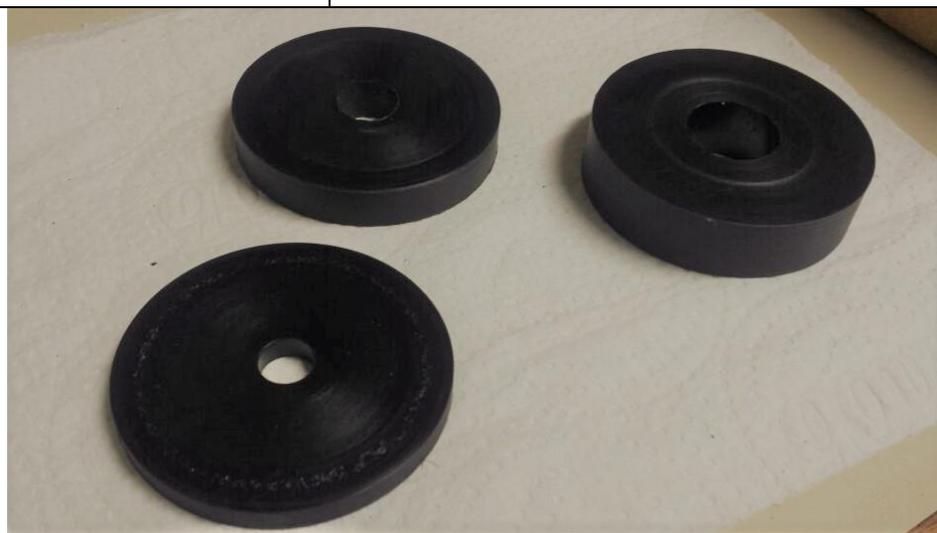


Figura 7 - Peças usadas como molde para montar os detectores

4.1 Instrumentação do detector baseado em fluorescência

O diagrama básico do detector baseado em fluorescência adotado neste projeto é apresentado na Figura 8.

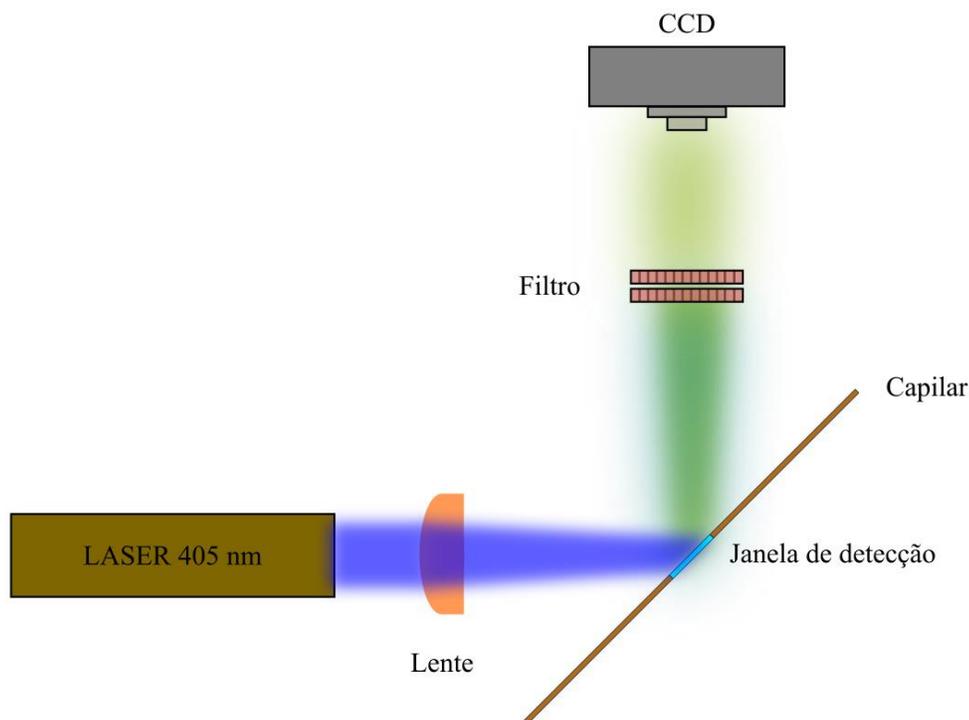


Figura 8 – Diagrama básico de um detector baseado em fluorescência

Neste tipo de detector, um LASER é focalizado com auxílio de uma lente plano-convexo na janela de detecção aberta no capilar, em amostras que possuam grupos fluoróforos. Na região do capilar onde a luz do LASER incide, ocorrerá absorção de energia pelos elétrons dos grupos fluoróforos. A subsequente perda de energia através da emissão de luz por estes grupamentos possibilita identificar e quantificar o comprimento de onda emitido, e conseqüentemente algumas propriedades das moléculas do analito. Neste projeto, esta luz é então filtrada, e capturada por uma câmera CCD.

No presente trabalho, este diagrama foi utilizado para construção do detector de fluorescência, acoplando a câmera CCD e o filtro no plano ortogonal à página (tendo como base o diagrama apresentado na Figura 8).

Na Figura 9, são mostradas as vistas laterais e superior das peças usadas.

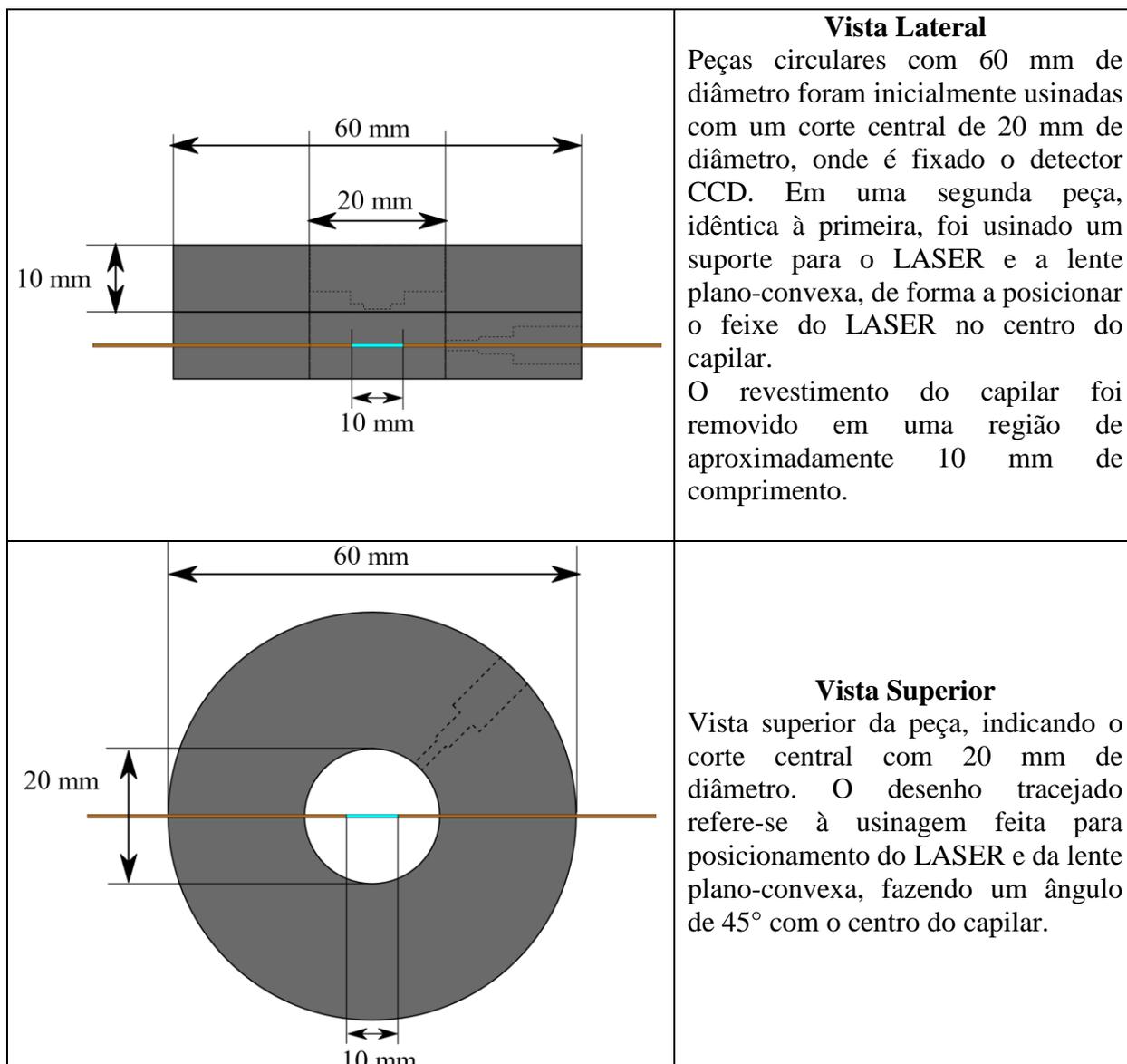


Figura 9 - Vista frontal e vista superior do detector

Inicialmente é necessário escolher um LASER com comprimento de onda que seja adequado à faixa de excitação dos analitos a serem investigados pelo equipamento. Foi escolhido um LASER com comprimento de onda centrado em 405 nm e potência de aproximadamente 10 mW, devido a sua ampla aplicabilidade em equipamentos de cromatografia líquida, sendo um LASER com mais de 17 anos de utilização neste mercado [13]. É válido ressaltar que o detector foi construído de modo a ter seus componentes facilmente substituídos, incluindo-se o LASER. Foi utilizada uma lente plano-convexa ajustada para deixar o *spot* do LASER da ordem de

grandeza do diâmetro do capilar. Esta lente foi fixada na estrutura metálica do LASER, e o processo de aplicação da cola e posicionamento da lente são mostrados na Figura 10.

Os capilares vêm de fábrica com um revestimento de poliamida, que deve ser removido apenas na região que será excitada pelo LASER. Para isso, é aplicado ácido sulfúrico e o capilar é aquecido por alguns minutos, até que a poliamida seja totalmente removida (Figura 11). Em seguida, o LASER foi posicionado e alimentado com uma fonte de corrente de aproximadamente 45 mA (Figura 12).

O diâmetro do feixe do LASER incidente no capilar, após ser convergido pela lente, é de aproximadamente 3 diâmetros do capilar, ou 1,3 mm. O LASER foi alinhado de forma a ficar bem centralizado com o capilar, e desta forma produzir a excitação necessária por toda seção transversal deste. O alinhamento foi feito analisando-se a absorção causada pelo capilar quando visto em um anteparo, como mostrado na Figura 13.

Os fótons emitidos pela amostra são detectados por uma câmera CCD comercial (Modelo HDL HM54-DN HAD II), acoplada em uma peça molde encaixada na parte superior da peça do LASER. Esta câmera CCD tem um limiar de detecção absoluto de 10 mLux, considerado adequado para as análises a serem feitas no equipamento.

Foi escolhido incidir o LASER com um ângulo de 45° no capilar, em uma tentativa de reduzir reflexões internas pelo próprio capilar – um problema enfrentado anteriormente em detectores do laboratório. A intensidade da luz do LASER refletida pelo capilar pode ser analisada qualitativamente colocando-se um anteparo na direção do capilar (Figura 14). Reflexões internas no comprimento de onda de 405 nm podem gerar sinais indesejáveis no CDD, e desta forma devem ser evitados. Foi adicionado um filtro passa-alta de 455 nm na entrada do sensor CCD, reduzindo consideravelmente os ruídos gerados pelo próprio LASER.

Testes iniciais com este sistema de detecção no equipamento de HPLC do Laboratório de Métodos mostraram resultados satisfatórios, porém a intensidade dos picos de fluorescência para amostras padrão de ácidos carboxílicos variavam consideravelmente entre repetidas medidas, e a intensidade luminosa do LASER reduziu várias ordens de grandeza após 30 h de operação não-contínuas. Na Figura 15, é possível analisar qualitativamente a diferença na potência luminosa de um LASER utilizado por aproximadamente 30 h (não-contínuas), e de um LASER novo.

Medições de temperatura na parte traseira do diodo do LASER com um pirômetro comercial, observou-se que a temperatura de operação estabilizou em aproximadamente 68° C, após 8 minutos de operação contínua - apesar da alimentação com fonte de corrente estar dentro do recomendável, de 45 mA. Esta temperatura é muito além da recomendável para LASERs de diodo [11].

Com a adição de um *cooler* de refrigeração na parte traseira do LASER, a temperatura se estabilizou em aproximadamente 31° C, conforme pode ser visto no gráfico da Figura 16.

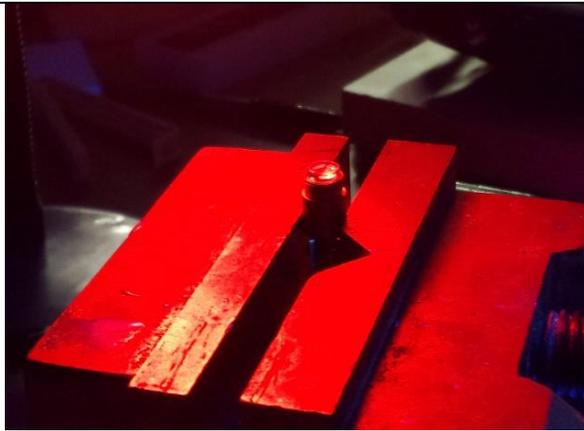


Figura 10 - Fixação da lente plano-convexo imediatamente na saída do feixe do LASER.

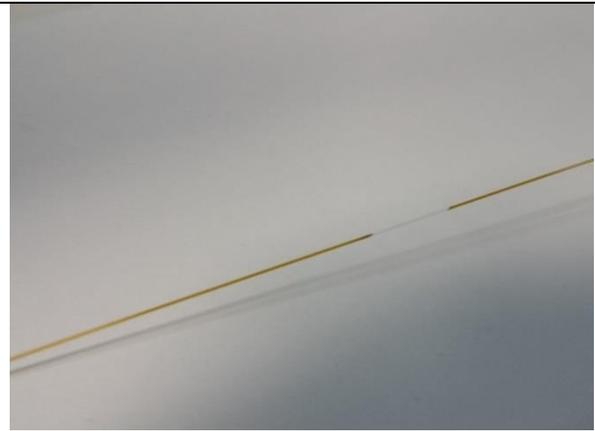


Figura 11 - Remoção do revestimento do capilar criando a janela de detecção.

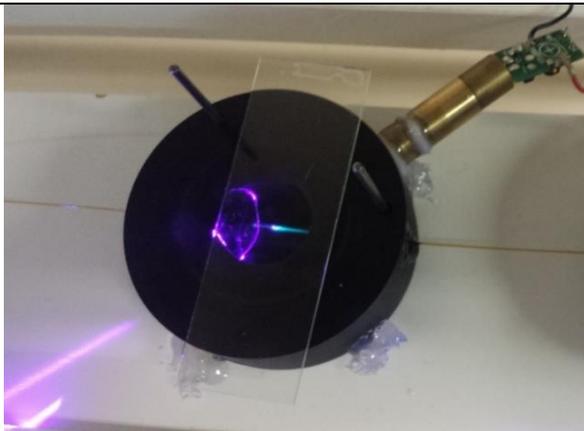


Figura 12 - Posicionamento da janela de detecção no centro do detector.

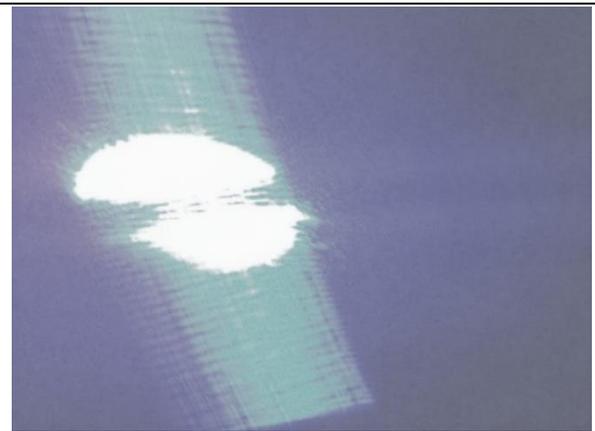


Figura 13 - Alinhamento do LASER com o centro do capilar. A região sombreada refere-se ao capilar.



Figura 14 - Reflexões internas do LASER no capilar. Necessidade de usar filtros.

??

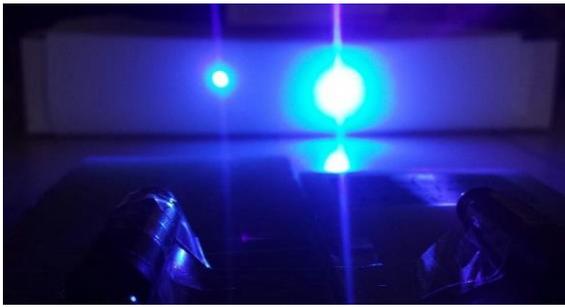


Figura 15 - Intensidade do LASER após aproximadamente 30h de operação (esquerda), e de um LASER novo (direita).

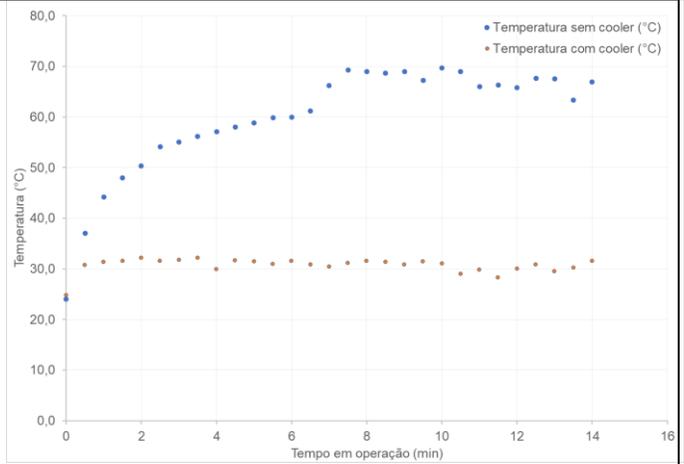


Figura 16 - Gráfico da temperatura na parte traseira do diodo do LASER em função do tempo de operação contínuo - sem sistema de refrigeração (azul), e com sistema de refrigeração (laranja).

4.2 Instrumentação do detector baseado em espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis

O diagrama básico do detector baseado em espectrofotometria de absorção adotado neste projeto é apresentado na Figura 17, e foi baseado em detectores deste tipo encontrados na literatura [14].

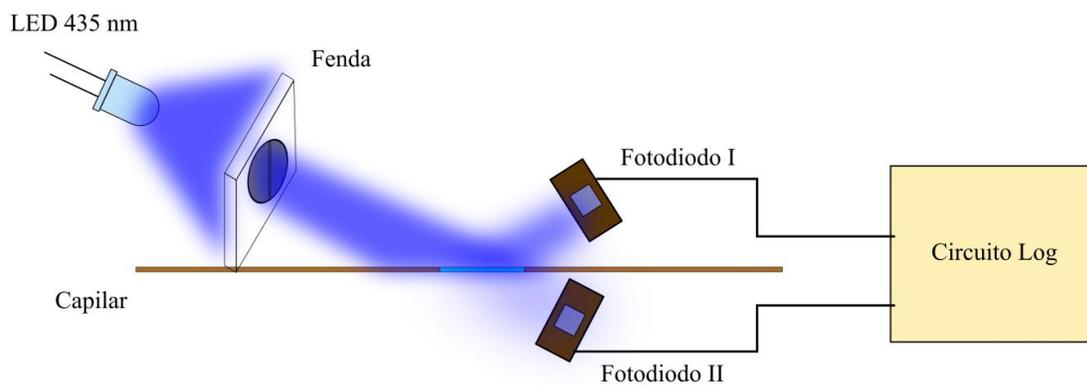


Figura 17 - Diagrama básico do detector baseado em espectrofotometria de absorção.

Na Figura 18, são mostradas as vistas lateral e superior das peças usinadas. O detector consiste em duas peças cilíndricas de 10 mm de altura e 60 mm de diâmetro sobrepostas. A luz incidente de um LED é medida antes e após a absorção, por dois fotodiodos diferentes. O detector foi feito de tal forma a possibilitar a adição de um outro LED na peça adjacente, possibilitando a realização de análises em outro comprimento de onda pela simples inversão do sinal dos fotodiodos I e II.

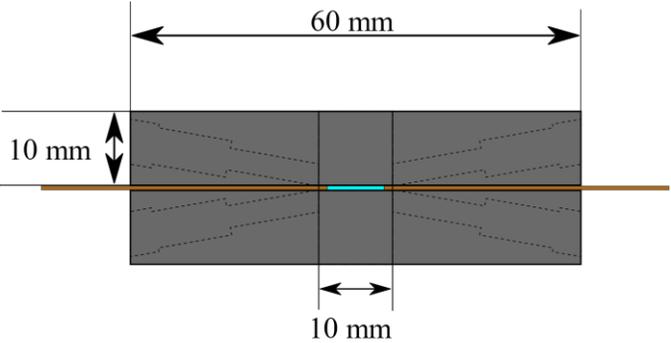
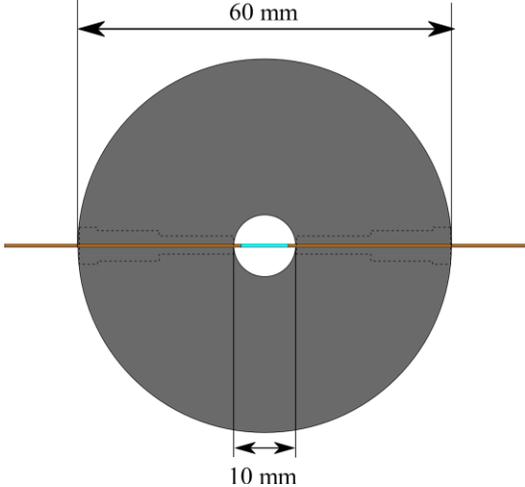
	<p>Vista Lateral</p> <p>Peças circulares com 60 mm de diâmetro foram inicialmente usinadas com um corte central de 10 mm de diâmetro, onde foram fixadas a fenda e o capilar. O suporte para os LEDs e fotodiodos foi feito usinando a peça em ângulo de aproximadamente 10°, de modo a centralizar o eixo do LED e fotodiodo com o capilar. O revestimento do capilar foi removido em uma região de aproximadamente 10 mm de comprimento.</p>
	<p>Vista Superior</p> <p>Vista superior da peça, indicando o corte central de 10 mm de diâmetro. O desenho tracejado refere-se à usinagem feita para posicionamento dos LEDs e dos fotodiodos.</p>

Figura 18 - Vista frontal e superior do detector.

Para a montagem do detector baseado em absorção, optou-se pela utilização de fontes LED na iluminação, visto seu baixo custo, ampla variedade de comprimentos de onda disponíveis e relativa facilidade de manuseio em comparação com LASERs de diodo. Uma das desvantagens do LED é que sua luz é difusa, e a fim de evitar dispersões internas no capilar e na própria estrutura do detector é necessário que a luz seja focalizada apenas para a região onde passará a amostra internamente ao capilar. Uma maneira simples de fazer isso é criando uma fenda da ordem de grandeza do diâmetro do capilar. No presente trabalho, isso foi feito fixando-se duas lâminas na superfície de uma das peças cilíndricas, com espaçamento aproximado de 400 μm ,

como pode ser visto na Figura 19. O encaixe do LED foi usinado em ângulo de aproximadamente 10° de forma a melhor direcionar o feixe para a seção da janela de detecção do capilar (Figura 20). O posicionamento de LEDs no detector foi pensado de forma a dar bastante liberdade para troca e substituição, através do direto encaixe e desencaixe do componente. A peça cilíndrica foi usinada de forma a prover tal característica. A Figura 21 mostra a vista lateral do detector já montado, onde podem ser visto o LED na esquerda, e as conexões dos dois fotodiodos OPT101 na direita.

Na Figura 22 pode-se ver a etapa de posicionamento do capilar sobre a parte inferior do detector, sobre as duas lâminas. O sentido do capilar é o mesmo que aponta o LED e os OPT101. Os fotodiodos foram colados na estrutura do detector com cola de silicone preto.

Na Figura 23 é mostrado o detector com o LED ligado. No anteparo, é possível identificar dois *spots* de luz. O *spot* de maior intensidade é proveniente das reflexões nas lâminas e no capilar, e é um parâmetro constante independente da análise sendo feita. Portanto, sua intensidade será medida como referência com a utilização de um fotodiodo (modelo OPT101 [1], referente ao *Fotodiodo I*, na Figura 17). O *spot* inferior, de menor intensidade, refere-se a luz que passou pelo capilar e foi absorvida pela amostra, e também terá seu sinal medido por um fotodiodo OPT101.

O fotodiodo converte a potência luminosa em corrente elétrica, medida através de uma diferença de potencial nos terminais do OPT101. Comparando-se este sinal de tensão entre os fotodiodos de referência e análise (ou pós absorção) através de um circuito log, é possível obter a grandeza de absorbância, definida no capítulo 3.

Este circuito log foi desenvolvido em uma placa de hardware com um microprocessador ATmega328. Nesta placa, as duas entradas analógicas de tensão elétrica (V) dos fotodiodos são digitalizadas por um conversor A/D de resolução de 10 bits, e através de implementação de código baseado na linguagem C é obtido o valor da absorbância de acordo com a Equação I. A taxa de amostragem do sinal analógico é de até 9600 amostras por segundo, e uma tabela contendo *tempo* e *absorbância* é salva em formato *.txt* ou *.csv*.

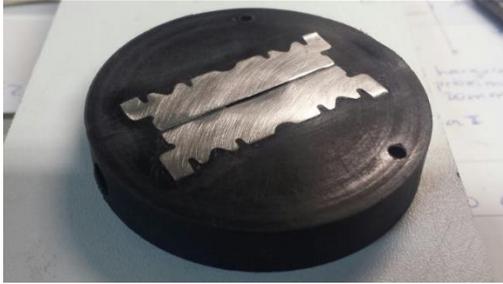


Figura 19 - Posicionamento de duas lâminas espaçadas por aproximadamente 400 μm .



Figura 20 - Usinagem em ângulo da peça para posicionamento do LED.



Figura 21 – Vista lateral do detector. Na esquerda pode ser visto o LED, e na direita os dois fotodiodos OPT101..



Figura 22 - Posicionamento do capilar sobre a parte inferior do detector.

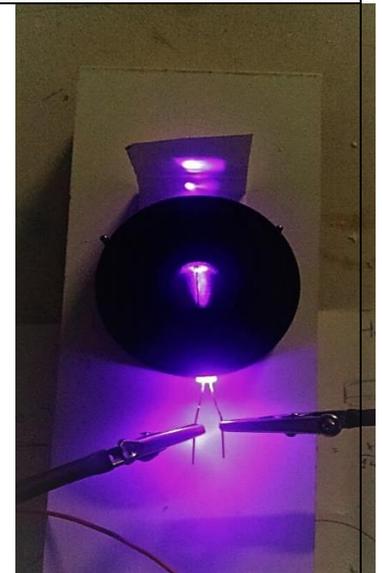


Figura 23 - Estrutura do detector com o LED ligado.

5. Caracterização do sistema de detecção/Validação do Método

Nesta etapa do projeto, objetiva-se caracterizar os detectores baseados em espectrofotometria por fluorescência e por absorção desenvolvidos conforme descrição no capítulo anterior. Todas as caracterizações foram feitas utilizando as ferramentas e apoio do Laboratório de Métodos na UFRGS.

Por caracterização entende-se o processo de avaliar as características descritas na seção 3.2.1 [15]. Assim que o detector baseado em fluorescência ficou pronto, este já começou a ser testado e utilizado em um projeto de avaliação de ácidos carboxílicos de um aluno de mestrado do laboratório. Até o momento da divulgação deste trabalho, apenas o detector baseado em fluorescência teve seus parâmetros medidos. As características de interesse para as análises em desenvolvimento no Laboratório de Métodos foram todas avaliadas.

Ácidos carboxílicos têm baixo coeficiente de absorção molar, e portanto, alternativas à detecção baseada em espectrofotometria de absorção devem ser buscadas. Através de agentes derivatizantes, é possível estimular fluorescência nos compostos derivatizados e assim identificá-los com detecção por fluorescência [16]. Para a caracterização do detector baseado em fluorescência deste trabalho, foi utilizada uma amostra com padrões de ácidos carboxílicos derivatizados em MPAC-Br. São eles: ácido cáprico, ácido láurico, ácido tridecanoico, ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido erúxico, ácido eicosanoico e ácido mirístico. A separação foi realizada em uma coluna Supelcosil LC-18-DB com 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, empacotadas com partículas de 5 μ m da Supelco Analytical (Bellefonte, EUA). O fluxo foi de 1,5 mL/min e a fase móvel foi TRIS-acetato de base tris com pH de 7,5 na proporção volumétrica de 1:9 com metanol (fase móvel A), e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente programado foi de: 0-20 min com 10% de B; 20-35 min com 10%B-100%B; 35-45 min com 100% de B; 45-50 min com 100%B-10%B; 50-60min com 10%B.

No Anexo A são apresentadas as estruturas químicas dos ácidos carboxílicos estudados e a formulação da reação de derivatização entre o derivatizante MPAC-Br e os ácidos carboxílicos.

O cromatograma resultante desta análise com ácidos carboxílicos derivatizados é apresentado na Figura 24.

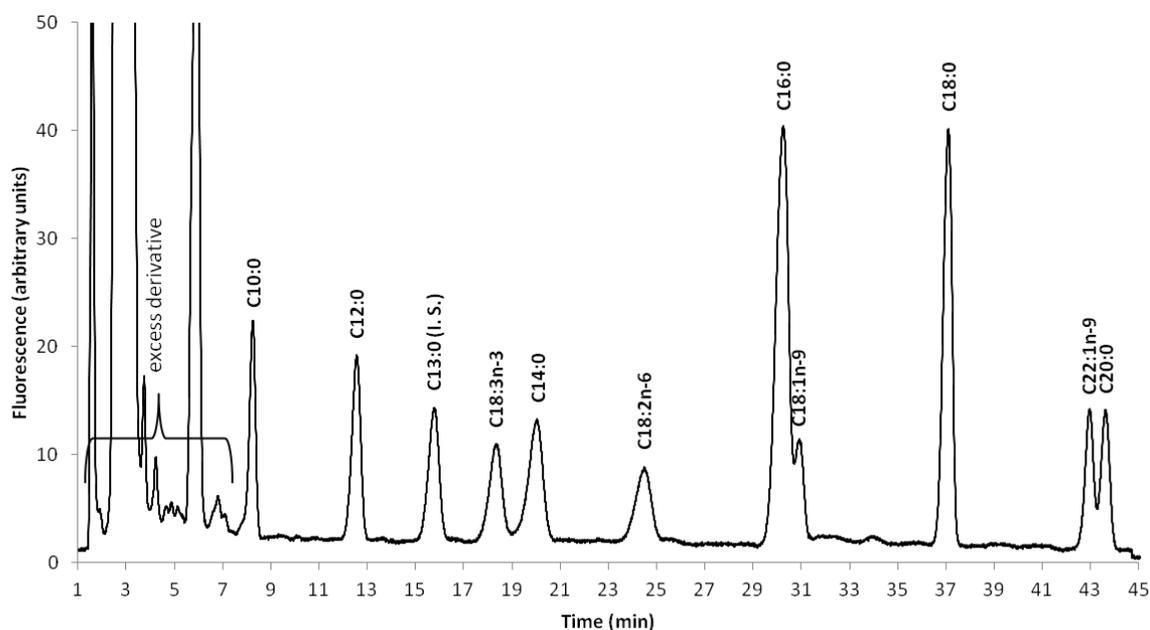


Figura 24 - Cromatograma de uma amostra com padrões de 11 ácidos carboxílicos derivatizado em MPAC-Br, com concentrações individuais de 56,25 nmol/L. C10:0, ácido cáprico; C12:0, ácido láurico; C13:0, ácido tridecanoico; C18-3n-3, ácido linolênico; C14:0, ácido mirístico; C18-2n-6, ácido linoléico; C16:0, ácido palmítico; C18:1n-9, ácido oléico; C18:0, ácido esteárico; C22:1n-9, ácido erúico; C20:0, ácido eicosanoico.

5.1 Flutuações na linha de base do cromatograma

A flutuação na linha de base do cromatograma foi avaliada através da medida de uma série de sinais em branco, ou seja, sem a passagem de nenhum analito pela janela de detecção. As flutuações resultantes de um sinal exemplo são mostradas na linha em preto na Figura 25. A linha em laranja refere-se a este sinal do ruído após passar por um filtro digital do tipo *moving average* com $N=20$, o que significa que cada ponto em laranja é uma média dos 20 pontos registrados anteriormente. Esse filtro elimina sinais de maior frequência e é um indicativo qualitativo do ruído de *drift* do detector. A linha em laranja refere-se à este sinal do ruído após passar por um filtro digital do tipo *moving average* com $N=20$, o que significa que cada ponto em laranja é uma média dos 20 pontos registrados anteriormente. Esse filtro elimina sinais de maior frequência e é um indicativo qualitativo do ruído de *drift* do detector.

Para a medição do ruído do detector, deixou-se o detector ligado por um período de aproximadamente 10 minutos para garantir que este estava operando em condições estáveis e em

concordância com a realidade de uma medição. Para a medida indicada na figura abaixo, é possível verificar que o ruído atingiu uma intensidade máxima de sinal de aproximadamente 10,50%, e uma intensidade mínima de aproximadamente 10,05%, com um desvio padrão de 0,01%. Este valor é uma medida da magnitude da dispersão das intensidades do ruído ao redor de um valor médio, e é utilizado para o cálculo dos limites de detecção (LOD) conforme a equação 2.

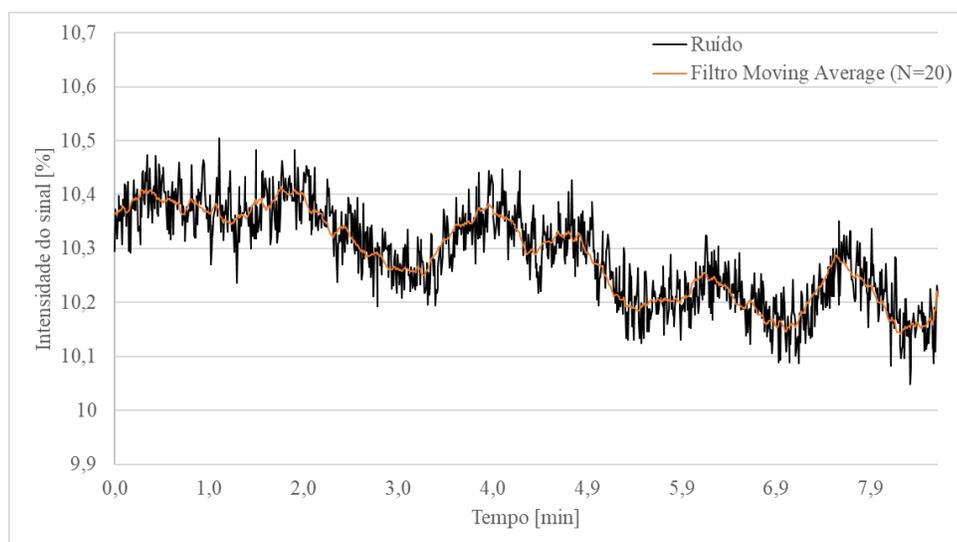


Figura 25 - Medição do ruído do detector. Foi utilizado um intervalo de aproximadamente 8 minutos.25.

5.2 Identificação dos picos

Variações na injeção de amostras do equipamento do HPLC, na composição da fase móvel, temperatura, vibrações mecânicas, variações da corrente elétrica através do diodo do LASER são, entre outros fatores, intrínsecas às medidas do equipamento, em maior ou menor grau. Estas instabilidades devem ser levadas em conta na análise de um cromatograma.

O primeiro passo para realizar uma análise quantitativa de um cromatograma é remover a linha de base sobre a qual os picos são medidos, que em geral oscila durante uma medida, a fim de se modelar matematicamente o pico medido. A metodologia para se fazer isso é conforme mostrado na Figura 26, onde os picos do cromatograma foram separados individualmente. Uma linha base (em laranja) é traçada unindo os pontos onde o pico começa e termina. O ponto onde o pico começa é indicado por T_i na legenda, e representa o tempo após o início da análise que este

pico começou a ser medido. O ponto de término foi chamado de *Tf*. Reconhecendo-se essa linha de base, o pico é então modelado por uma gaussiana e medidas como a área, largura a meia altura (FWHM) e altura do pico são obtidas através de cálculos utilizando a ferramenta Excel. No caso de dois picos não estarem completamente resolvidos, como no caso dos picos registrados entre 29 e 31 minutos e apresentados por último na Figura 26, é apropriado traçar uma reta perpendicular caso o pico menor tenha mais de 10% da altura do maior.

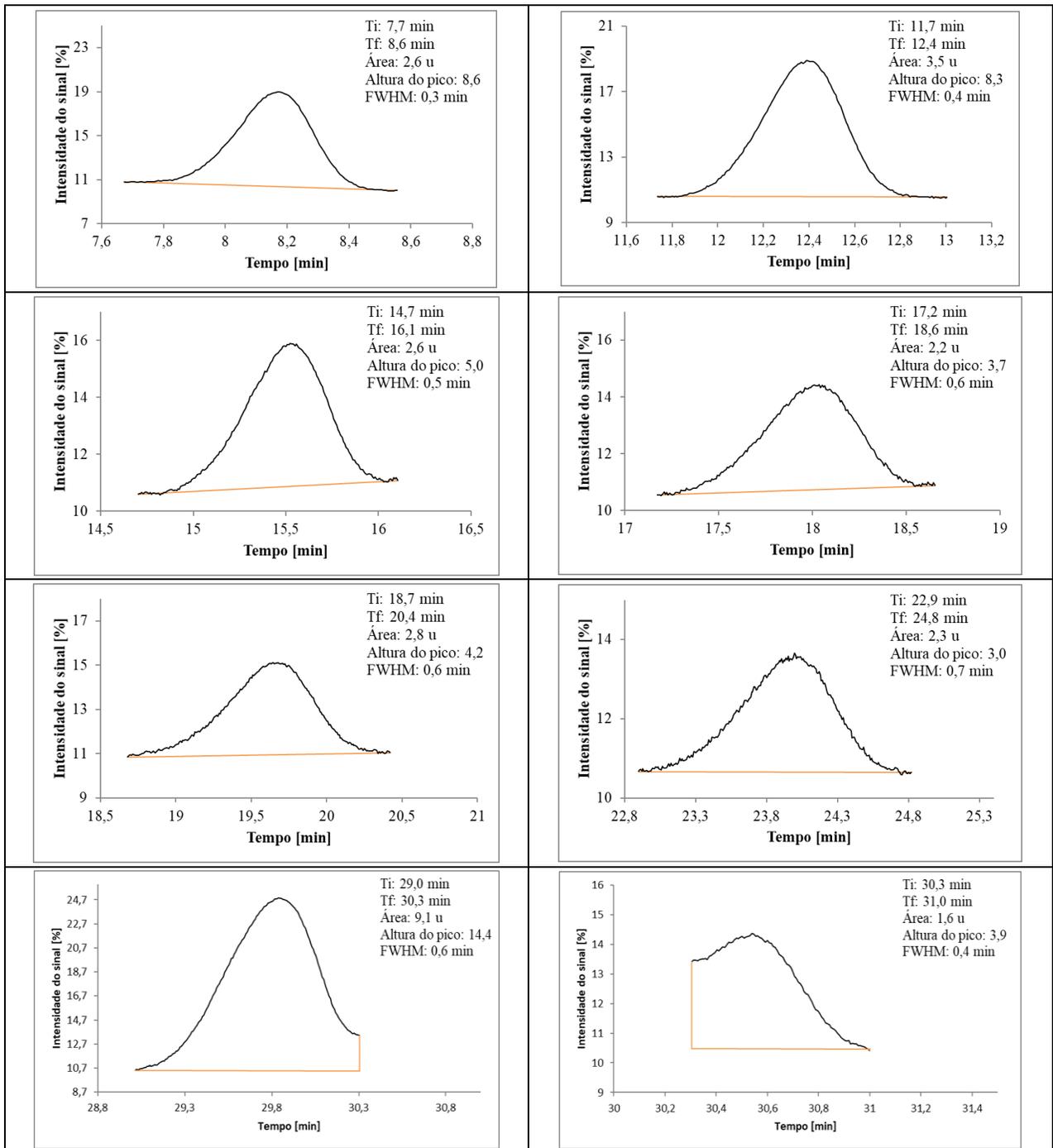


Figura 26 - Picos individuais do cromatograma de amostras de padrões de ácidos carboxílicos derivatizados.

5.3 Calibração

As curvas de calibração para o detector baseado em fluorescência foram feitas a partir de 5 concentrações diferentes de 11 ácidos carboxílicos derivatizados distintos. A linearidade foi medida apenas para o intervalo de concentrações de interesse deste trabalho, sendo utilizadas as concentrações de ácidos carboxílicos padrão de 28,1 nmol/L, 56,2 nmol/L, 112,5 nmol/L, 225,0 nmol/L e 450,0 nmol/L. Cada medida foi repetida cinco vezes.

Na a seguir são apresentados os resultados referente às áreas dos picos para todas as 5 concentrações, e para as 5 repetições feitas. O cálculo das áreas foi feito conforme explicado na seção 5.2, e por questões práticas foi adotado “unidades de área”, ou “u.a.” como unidade referente à integração dos picos mostrados na Figura 26. A seguir são apresentados os resultados referente às áreas dos picos para todas as 5 concentrações, e para as 5 repetições feitas. O cálculo das áreas foi feito conforme explicado na seção, e por questões práticas foi adotado “unidades de área”, ou “U.A.” como unidade referente à integração dos picos mostrados na .

Tabela 1 - Tabela com as áreas correspondentes às 5 medidas e para 5 concentrações diferentes de ácido esteárico.

Concentração [nmol/L]	Área do pico [u.a.]				
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5
28,1	1,39	1,40	1,40	1,29	1,40
56,3	2,78	2,80	2,80	2,77	2,79
112,5	5,57	5,60	5,60	5,55	5,58
225,0	11,13	11,20	11,20	11,09	11,17
450,0	22,26	22,41	22,41	22,18	22,34

O gráfico referente às 5 curvas é apresentado na ::::

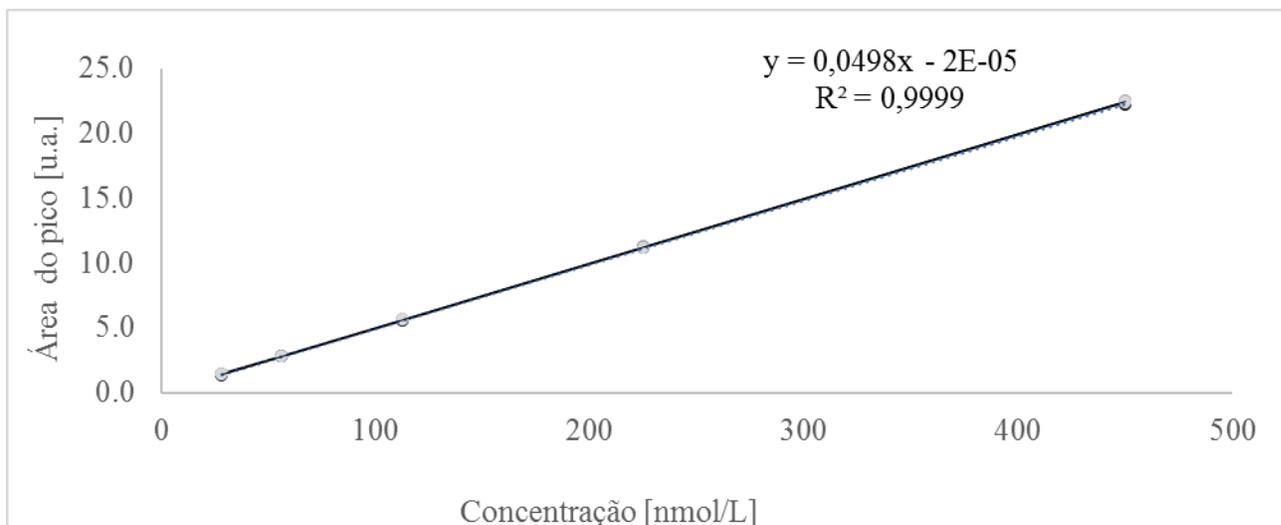


Figura 27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.27 - Reta de calibração do detector baseado em fluorescência. Amostra de ácido esteárico, em 5 concentrações distintas.

Através das medidas realizadas para estas concentrações de ácido esteárico, avaliadas através da ótima correlação entre áreas dos picos e concentração do analito, é possível afirmar que o detector baseado em fluorescência tem um ótimo comportamento linear na região de interesse para ácidos carboxílicos em estudo, que é entre 28,125 nmol/L e 450 nmol/L, baseado no coeficiente $r^2 > 0,99$.

5.4 Cálculo do Limite de Detecção (LOD)

Conforme já discutido na seção 3.2.1, existem diferentes metodologias para se determinar o limite de detecção de um instrumento. Para o cálculo do limite de detecção neste projeto, foi utilizado a metodologia de determinar a concentração em que um analito gera um pico com uma intensidade de sinal/ruído de 3 unidades. A razão de se optar por esta metodologia é de que o método de avaliação do LOD pela curva de calibração gera resultados bastantes discrepantes com a realidade devido ao baixo desvio padrão obtido nas análises feitas, conforme visto na tabela a seguir e em acordo com a equação. Apenas para ilustração dos resultados obtidos através deste último método, analisando a medida 1 da curva de calibração para o cálculo do limite de detecção seria: seria:

Tabela 2 - Cálculo do limite de detecção baseado na curva de calibração do detector.

Medida 1			
Concentração [nmol/L]	Área	Estatística:	
28	1,4	Interceptação eixo-y	-1,8E-15
56	2,8	Coef. Angular	4,9E-02
113	5,6	RSD	3,3E-05
225	11,1	Limit of Detection [nmol/L]:	2,2E-03
450	22,3		

A experiência adquirida com instrumentação física e comparação com outros detectores semelhantes sugerem que o resultado de limite de detecção de apenas 2,2 pmol/L pode não ser realista, e pelos valores baixos de desvio padrão, levam a crer que este não é o método mais indicado para o cálculo neste caso, e por isso foi escolhido o método do S/N maior do que 3 unidades no cálculo do LOD.

Com um pouco de álgebra, chega-se que o LOD com base neste método pode ser expresso por:

$$LOD = \frac{3C\sigma}{h} \quad \text{[Equação 4]}$$

Onde C é a concentração da amostra em estudo, neste caso 56,25 nmol/L, σ é o desvio padrão do sinal de base, já indicado como 0,01%, e h é a altura do pico, descontando-se a linha base.

Com as informações já obtidas na extração dos picos do cromatograma, é possível determinar o limite de detecção para cada um dos ácidos carboxílicos apresentados na Figura 26. A tabela a seguir apresenta resultados obtidos para alguns deles:

Ácido carboxílico	Altura do pico	Limite de detecção [nmol/L]
Ácido erúcido	14,9	0,9
Ácido palmítico	14,4	0,9
Ácido cáprico	8,6	1,6
Ácido láurico	8,3	1,6

Ácido tridecanoico	5,0	2,7
Ácido mirístico	4,2	3,2
Ácido oleico	3,9	3,4

É importante ressaltar que estes valores podem sofrer variações significativas dependendo do método utilizado para quantificá-los. Além disso, é essencial que numa próxima etapa estes valores sejam comparados com equipamentos semelhantes de outros laboratórios, e mesmo com outros tipos de detectores para estes mesmos ácidos carboxílicos.

6. Resultados e Discussão

Neste Trabalho de Diplomação em Engenharia Física, foram desenvolvidos dois detectores a serem aplicados em equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O primeiro detector é baseado em espectrofotometria por fluorescência, e foi montado utilizando um LASER com comprimento de onda centrado em 405 nm e 10 mW de potência. Sua performance foi avaliada através de medidas da curva de calibração, flutuações na linha de base e cálculos do limite de detecção para padrões de ácidos carboxílicos derivatizados. O segundo detector foi baseado em espectrofotometria de absorção no UV-Vis, e utiliza um LED com comprimento de onda centrado em 435 nm. Este detector já está completamente montado, mas ainda carece de medidas de caracterização das suas características – o que deve ser feito sob acompanhamento de alguma pessoa habilitada a operar o equipamento de HPLC.

Todos os desenhos para a confecção das peças dos detectores foram indicados no desenvolver deste texto. Foi possível construir estes dois detectores utilizando materiais de fácil acesso, e usufruindo em grande parte da infraestrutura do Laboratório de Métodos.

Os conhecimentos adquiridos durante o curso de graduação em Engenharia Física foram essenciais para o desenvolver deste trabalho. Em especial, pela multidisciplinaridade deste projeto, envolvendo conceitos de ciências dos materiais, química, óptica, eletrônica, programação, dentre outros.

Cabe dizer que os resultados preliminares deste trabalho de Diplomação foram recentemente aprovados para publicação em pôster no *34th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis*, a ser realizado na cidade do Rio de Janeiro em fevereiro de 2018, além de ter contribuído nos resultados do projeto de mestrado do laboratório envolvendo ácidos carboxílicos.



7. Sugestões para trabalhos futuros

Vários aprendizados durante o desenvolvimento deste projeto poderão ser utilizados no futuro em projetos relacionados.

Primeiramente, é necessário completar a caracterização do detector baseado em espectrofotometria de absorção no UV-Vis. Para isso, é preciso analisar amostras de um certo padrão repetidas vezes e em concentrações diferentes, de forma a avaliar a linearidade, o ruído da linha de base, e o limite de detecção.

Além disso, é fundamental que uma comparação seja feita entre os resultados obtidos e valores usualmente encontrados para equipamentos comerciais, ou equipamentos semelhantes de outros laboratórios.

Os cabos utilizados para a alimentação do LASER, do LED, do sistema de refrigeração e da câmera CCD, podem ser integrados em um único circuito; evitando assim uma quantidade excessiva de cabos no entorno da plataforma dos detectores.

A refrigeração do LASER pode ainda ser melhorada, adicionando-se *heat sinkers* na sua volta. Isso deve aumentar a vida útil do LASER.

8. Bibliografia

- [1] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*. 2010.
- [2] M. Swartz, “HPLC detectors: A brief review,” *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 33, no. 9–12. pp. 1130–1150, 2010.
- [3] C. H. Collins, “Michael Tswett e o ‘nascimento’ da Cromatografia,” *Sci. Chromatogr.*, vol. 1, no. 1, p. 20, 2009.
- [4] S. C. Cheng, M. Z. Huang, and J. Shiea, “Thin layer chromatography/mass spectrometry,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 19. pp. 2700–2711, 2011.
- [5] W. Applications *et al.*, “Exploring the Widespread Applications of Chromatography and Unveiling Advances in HPLC,” *Int. Conf. Exhib. Adv. HPLC Chromatogr. Tech.*, 2016.
- [6] H.-H. Perkampus, *UV-VIS spectroscopy and its application*, vol. 12, no. 7. 1992.
- [7] Ich, “ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology,” *Int. Conf. Harmon.*, vol. 1994, no. November 1996, p. 17, 2005.
- [8] ICH, “Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology,” *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. Regist. Tripart. Guidel.*, no. November, p. 13, 1996.
- [9] H. Canada, “Acceptable Methods Guidance,” no. February, p. 18, 1999.
- [10] Desimoni; Brunetti B., “About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach,” vol. 6, no. 3, 2015.
- [11] J. E. Melanson, C. A. Boulet, and C. A. Lucy, “Indirect laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis using a violet diode laser,” *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 8, pp. 1809–1813, 2001.
- [12] J. Cazes, “Analytical instrumentation handbook, 3rd edition,” *IEEE Electrical Insulation Magazine*, vol. 22, no. 4. pp. 62–63, 2006.
- [13] J. E. Melanson and C. A. Lucy, “Violet (405 nm) diode laser for laser induced fluorescence detection in capillary electrophoresis,” *Analyst*, vol. 125, no. 6, pp. 1049–1052, 2000.
- [14] P. J. Lu *et al.*, “Robust and economical multi-sample, multi-wavelength UV/vis absorption and fluorescence detector for biological and chemical contamination,” vol. 32110, 2012.
- [15] C. Beatriz, G. Bottoli, C. H. Collins, C. Sales, and F. Jardim, “VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS,” *Quim. Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 771–780, 2004.
- [16] E. . Lima and D. S. . Abdalla, “High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 465, no. 1–2, pp. 81–91, 2002.

Anexo A

Na Figura 28 abaixo, a reação de derivatização entre o derivatizante MPAC-Br com ácidos carboxílicos, representados como COOH ligados a um radical R.

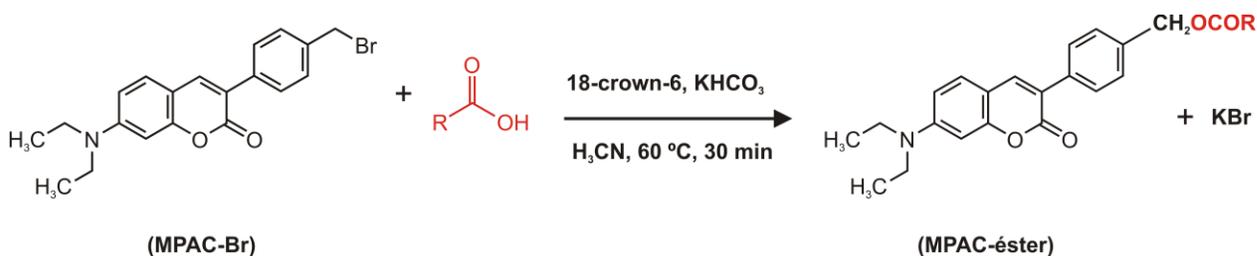
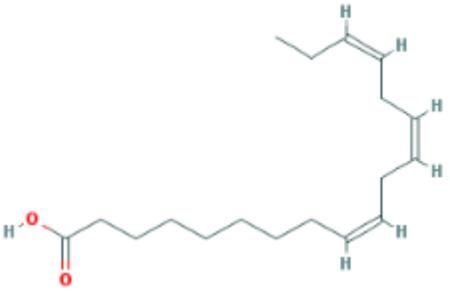
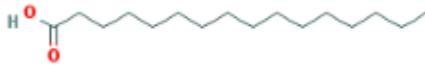
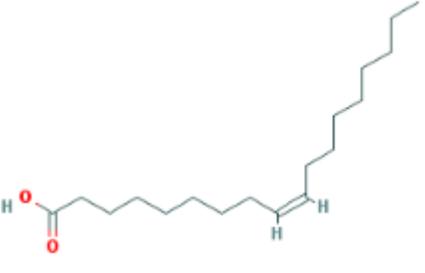
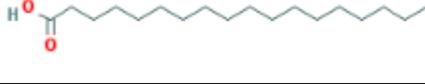
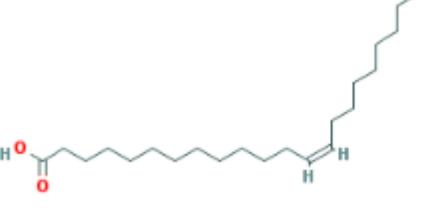


Figura 28 - Reação de derivatização entre MPAC-Br e ácidos carboxílicos.

Na tabela a seguir, são apresentados a nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química dos ácidos carboxílicos que foram utilizados na caracterização do detector baseado em espectrofotometria de fluorescência

Tabela 3 - Nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química dos ácidos carboxílicos estudados neste trabalho.

Nomenclatura IUPAC	Fórmula molecular	Estrutura química
Ácido decanoico	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	
Ácido láurico	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	
Ácido tridecanoico	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	

Ácido linolênico	$C_{18}H_{30}O_2$	
Ácido mirístico	$C_{14}H_{28}O_2$	
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	
Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	
Ácido erúxico	$C_{22}H_{42}O_2$	
Ácido eucosanoico	$C_{20}H_{40}O_2$	