

# Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



## Volume II

Módulo 1: Micropipetas

Módulo 2: Água para Análises Químicas

Módulo 3: Instrumentação Analítica



**Agência Nacional  
de Vigilância Sanitária**



Gerente-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos  
Antônio Carlos da Costa Bezerra

Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência  
Cláudia Franklin de Oliveira

E-mail: [bioequivalencia@anvisa.gov.br](mailto:bioequivalencia@anvisa.gov.br)

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência**

**Volume II**

Brasília  
2002

Direitos reservados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
SEPN 515, Edifício Ômega, Bloco B, Brasília (DF), CEP 70770-502.  
Internet: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

Copyright © 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.  
Permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte.

1ª edição - 2002

ISBN: 85-88233-06-1

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Realização: Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência - Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos

Coordenação Geral: Cláudia Franklin de Oliveira / Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência

Revisão: Karla de Araújo Ferreira / Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência

Divulgação: Unidade de Divulgação

Capas: João Carlos de Souza Machado / Gerência de Comunicação Multimídia

Diagramação, composição e impressão: Dupligráfica Editora Ltda./DF

Impresso no Brasil

Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília: ANVISA, 2002.

2 v.

QV38

1. Equivalência terapêutica. 2. Bioequivalência. 3. Disponibilidade biológica. 4. Medicamentos. I. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos.

Atualmente se acham em execução no Brasil inúmeros estudos clínicos com o objetivo de avaliar a Biodisponibilidade/Bioequivalência de produtos farmacêuticos. A partir de junho de 2001, a Anvisa, por meio da Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência – ligada à Gerência-geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos –, passou a avaliar estes centros em inspeções periódicas, a fim de garantir a qualidade dos estudos.

No decorrer das atividades de inspeção, que a princípio tinham caráter orientativo, a coordenação observou a necessidade de esclarecer alguns pontos que restavam como dúvidas técnicas para os centros, em especial a relativa à padronização de métodos analíticos, análise estatística dos estudos, armazenamento de amostras biológicas, confinamento de voluntários e estudos de estabilidade de fármacos, entre outros.

A partir da identificação desta necessidade, e buscando prevenir o comprometimento da qualidade dos trabalhos realizados, surgiu a iniciativa da criação pela coordenação de núcleos de discussão, com o objetivo de esgotar o esclarecimento de todos os aspectos relevantes à condução dos estudos e integração de suas fases. Esses núcleos contaram com a participação de 40 especialistas das áreas de Farmácia, Medicina, Estatística e Química.

É neste contexto que surge este “Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência”, composto por seis grandes tópicos apresentados de maneira didática, buscando transpor as dificuldades dos centros, e, por conseguinte, complementar as diretrizes já previstas na legislação sanitária brasileira para a realização dos estudos.

Os núcleos de trabalho iniciaram as discussões em setembro de 2001, cada um deles cuidando de uma das três etapas do processo – Clínica, Analítica e Estatística –, sob a coordenação da Dra. Cláudia Franklin de Oliveira e inestimável colaboração da professora Sílvia Storpirts. Nos meses subsequentes, foram realizadas diversas reuniões, de modo a promover debates técnicos e a alcançar consenso nas questões. Desta forma, cada grupo elaborou um conjunto de tópicos relevantes que devessem constar no manual. Posteriormente, todos foram objeto de cuidadosa pesquisa e os resultados relatados de modo a propiciar um bom entendimento por parte do público-alvo. O manual completo levou 11 meses para ser concluído. Este processo envolveu a participação, no total, de cerca de 50 profissionais de diversas áreas do conhecimento, entre pesquisadores de universidades públicas, técnicos da Anvisa e fabricantes de instrumentação laboratorial e equipamentos. A todos estes colaboradores a Anvisa registra sua gratidão pela contribuição impar a um trabalho tão singular.

A estrutura final consta de dois volumes e cada qual possui três módulos. O primeiro volume traz detalhadas tecnicamente cada uma das etapas dos estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência na seqüência natural de sua condução: Módulo 1: Etapa Clínica, Módulo 2: Etapa Analítica e Módulo 3: Etapa Estatística. O segundo volume abrange aspectos importantes no que diz respeito à instrumentação laboratorial e equipamentos utilizados na execução da etapa analítica, considerados críticos no processo. Neste volume, o Módulo 1 refere-se à Fundamentos e Operação de Micropipetas,

o Módulo 2 aborda a Água para Análises Químicas Instrumentais e o Módulo 3 possui conteúdo relacionado à Espectrofotometria de Ultra Violeta Visível, Cromatografia em Fase Líquida (LC), Cromatografia em Fase Gasosa (GC), Sistemas de Cromatografia Acoplados a Detectores de Massa e Verificação de Desempenho de Instrumentos Analíticos.

É importante ressaltar o ineditismo, mesmo em nível internacional, da reunião de informações provenientes de diversas disciplinas em um único compêndio, buscando a sintetização de todos os aspectos que envolvem as Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência.

Claro fica que o objetivo maior deste trabalho é o de aperfeiçoar a qualidade dos ensaios de Biodisponibilidade/Bioequivalência realizados no Brasil, e, por conseguinte, contribuir em parte com a qualidade dos medicamentos genéricos disponíveis no mercado, por meio do fornecimento de subsídios técnicos amplamente estudados e minuciosamente elaborados. Neste sentido, esperamos contribuir para a capacitação dos Centros de Biodisponibilidade/Bioequivalência, além de promover a formação de monitores de estudos para a indústria farmacêutica nacional e ajudar a formar agentes multiplicadores de conhecimento nas universidades brasileiras.

A realização deste manual só foi possível graças ao importante trabalho de inúmeras pessoas e antecipadamente peço desculpas por eventual esquecimento de algum nome. Foram fundamentais os editores José Pedrazzoli Júnior (USF/Unifag) e João Antônio Saraiva Fittipaldi (Pfizer), e os colaboradores Fernanda Maria Villaça Boueri (Anvisa), Eliana Regina Marques Zlochevsky (Anvisa), Cláudia Simone Costa da Cunha (Ministério da Saúde) e Beatriz Helena Carvalho Tess (Ministério da Saúde), no módulo Etapa Clínica; os editores Cláudia Franklin de Oliveira (GGIMP/Anvisa), Rui Oliveira Macedo (UFPA), Flávio Leite (T&E Analítica) e Pedro Eduardo Froehlich (UFRGS), e os colaboradores Pedro de Lima Filho (GGMEG/SP), Davi Pereira de Santana (UFPE), Rafael Eliseo Barrientos Astigarraga (Cartesius), Silvana Calafatti de Castro (Unifag), Thaís Reis Machado, Jaime Oliveira Ilha (Cartesius), Itapuan Abimael Silva (Anvisa), Karen Noffs Brisolla (Anvisa), Marcelo Cláudio Pereira (Anvisa), no módulo Etapa Analítica; os editores Arminda Lucia Siqueira (UFMG), Chang Chiann (GGMEG/SP), Círcia Yuko Wada (Unicamp), Karla de Araújo Ferreira (Anvisa) e Gilberto Bernasconi (USF/Unifag), e os colaboradores Reinaldo Charnet (Unicamp) e Renato Almeida Lopes (Anvisa), no módulo Etapa Estatística; os editores Melissa M. Silva (Nova Analítica) e Walter Pereira (Nova Analítica), Fundamentos e Operação de Micropipetas; o editor José Muradian Filho (Millipore), Água para Análises Clínicas; os editores Ivan Jonaitis (Agilent), Renato Garcia Peres (Flowscience), Ricardo Lira (Flowscience), Renato Gouveia, José Aparecido Soares (Varian), Josué D.M. Neto (Sync Brasil) Juarez Araújo Filho (Sync Brasil), Alexandre Rosolia (Waters), Adauto Silva (Varian) e Reinaldo Castanheira (Agilent), Instrumentação Analítica; e a equipe de coordenação formada por Cláudia Franklin de Oliveira (GGIMP/Anvisa), Marcelo Cláudio Pereira (GGIMP/Anvisa), Max Weber Marques Pereira (GGIMP/Anvisa), Karla de Araújo Ferreira (GGIMP/Anvisa), Karen Noffs Brisolla (GGIMP/Anvisa), Itapuan Abimael da Silva (GGIMP/Anvisa) e Renato Almeida Lopes (GGIMP/Anvisa).

Dr. Gonzalo Vecina Neto

# Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume II

## Módulo 1: Micropipetas

**Volume II – Módulo 1 – Micropipetas: Fundamentos e Operação**

**Editores:**

- Melissa M. Silva – Nova Analítica
- Valter A. Pereira - Nova Analítica

**Coordenação:**

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva - ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla - ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira - ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira - ANVISA
- Max Weber Marques Pereira - ANVISA
- Renato Almeida Lopes – ANVISA



<b>1. DEFINIÇÃO</b> .....	5
1.1. Tipos de pipetas .....	5
<b>2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO</b> .....	6
2.1. Pipetas de deslocamento de ar .....	6
2.2. Pipetas de deslocamento positivo .....	8
<b>3. TÉCNICA DE OPERAÇÃO</b> .....	11
3.1. Como guardar a pipeta .....	11
3.2. Ajuste do volume .....	11
3.3. Encaixe da ponteira .....	12
3.4. Pré-rinsagem da ponteira .....	13
3.5. Aspiração .....	13
3.6. Dispensa .....	14
3.7. Ejeção de ponteiras .....	14
<b>4. PONTEIRAS</b> .....	15
4.1. Ponteiras para pipetas de deslocamento de ar .....	15
4.2. Ponteiras para pipetas de deslocamento positivo .....	15
<b>5. MANUTENÇÃO</b> .....	16
5.1. Limpeza .....	16
5.2. Troca de peças .....	17
5.3. Verificação da performance .....	20
<b>6. SUGESTÕES DE PROCEDIMENTOS</b> .....	21
<b>7. ANEXO I: EXEMPLO DE PROCEDIMENTO DE LIMPEZA</b> .....	22
7.1. Desmontagem .....	22
7.2. Limpeza .....	23
7.3. Montagem .....	23
<b>8. ANEXO II: VERIFICAÇÃO PADRÃO DA PERFORMANCE</b> .....	24
8.1. Considerações gerais .....	24
8.2. Condições ambientais da sala de teste .....	24
8.3. Operador .....	25
8.4. Ponteiras .....	25
8.5. Equipamentos utilizados no teste .....	25
8.6. O procedimento de verificação .....	27

<b>9. ANEXO III: PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO</b> .....	38
9.1. Química .....	39
9.2. Microbiologia e cultura celular .....	40
9.3. Biologia molecular .....	41
9.4. Espectro de ação dos métodos .....	44
9.5. Vantagens e desvantagens .....	45
9.6. Autoclavagem .....	46
9.7. Irradiação UV .....	46
9.8. Soluções químicas .....	46
<b>10. ANEXO IV: DEFINIÇÕES</b> .....	50
<b>11. GLOSSÁRIO E ABREVIACÕES</b> .....	51
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52

## 1. DEFINIÇÃO

Pipetas operadas por pistão são equipamentos para aspirar e dispensar volumes específicos de líquidos. As pipetas de um único canal possuem apenas um pistão. Já as pipetas de múltiplos canais possuem uma série de receptáculos simultaneamente. As pipetas podem ser ajustadas na fábrica para dispensar um dado volume ou dispensar volumes selecionados pelo usuário dentro de uma faixa de volume específica, por exemplo, entre 10  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$ . As pipetas operadas por pistão podem ser de dois tipos: deslocamento de ar e deslocamento positivo.

### 1.1. Tipos de pipetas

---

As pipetas podem ser projetadas das seguintes maneiras:

Em relação ao volume:

- Volume fixo, projetadas pelo fabricante para dispensar apenas seu volume nominal, como por exemplo 100 $\mu\text{L}$ .
- Volume variável, projetadas pelo fabricante para dispensar volumes selecionados pelo usuário dentro de uma faixa específica de volume.

Em relação ao pistão:

- Pode haver uma camada de ar entre o pistão e a superfície do líquido (pipetas de deslocamento de ar).
- O pistão está em contato direto com o líquido (pipetas de deslocamento positivo ou deslocamento direto). O capilar e o pistão podem ser reutilizáveis ou descartáveis.

## 2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Acopla-se a ponteira de plástico ou de vidro na pipeta. Com o pistão no limite inferior (posição de aspiração inferior), mergulha-se a ponteira no líquido que se deseja transferir. Quando o pistão sobe para a posição de aspiração superior, o líquido é aspirado. O volume do líquido é dispensado quando o pistão é impulsionado novamente para a posição inferior.

O princípio de funcionamento está detalhado abaixo de acordo com o tipo de pipeta (deslocamento de ar ou deslocamento positivo).

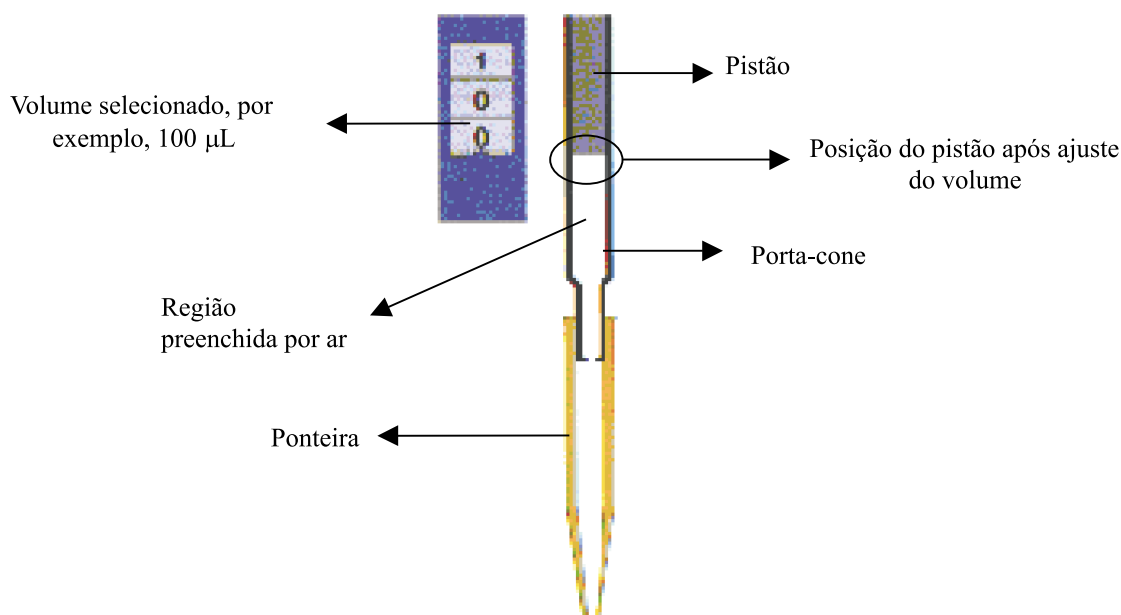
### 2.1. Pipetas de deslocamento de ar

Quando o botão de uma pipeta de deslocamento de ar é pressionado, o pistão localizado dentro do equipamento se move para baixo, deslocando o ar em contato com ele para fora da pipeta (o volume de ar expulso é igual ao volume ajustado na pipeta). O volume de ar que permanece dentro da pipeta é inversamente proporcional ao volume da amostra: quanto menor o volume de ar dentro da pipeta, maior o volume do líquido que será aspirado.

*a) Ajuste do volume (válido somente para as pipetas de volume variável)*

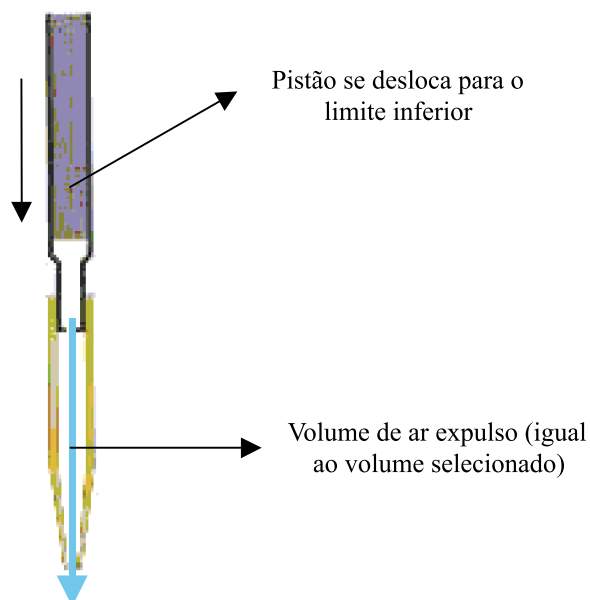
O usuário ajusta o volume desejado. O pistão se move para a posição apropriada.

*P.S.: nas pipetas de volume fixo, este posicionamento é feito na fábrica.*



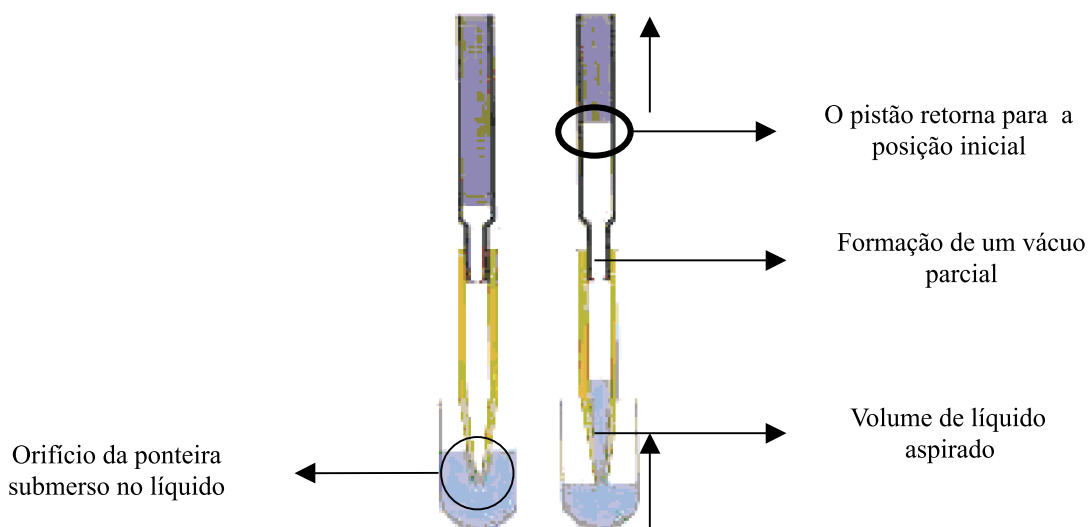
*b) Preparo para aspiração*

Pressiona-se o botão. O pistão se desloca para baixo e expela um volume de ar igual ao volume selecionado (nas pipetas de volume fixo o volume de ar expelido é igual ao volume nominal da pipeta).



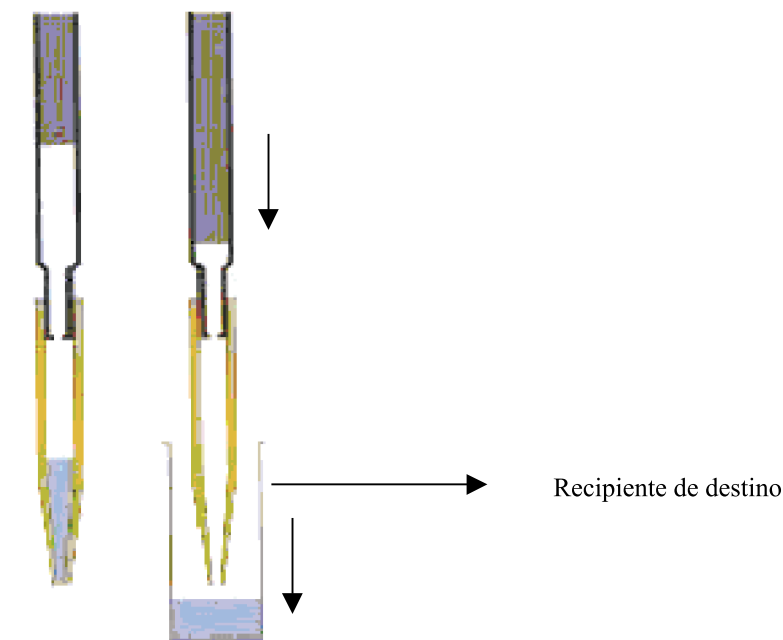
*c) Aspiração do líquido*

Mergulha-se a ponteira no líquido até que o orifício fique submerso. Ao se liberar o botão, o pistão retorna para a posição inicial e forma-se no interior da pipeta um vácuo parcial. A pressão atmosférica força a entrada do líquido pelo orifício da ponteira.



*d) Dispensa do líquido*

Pressiona-se novamente o botão. O pistão se move para baixo deslocando o ar e aumentando a pressão interna da pipeta. O ar comprimido expulsa o líquido para fora da ponteira.



*e) Segundo estágio*

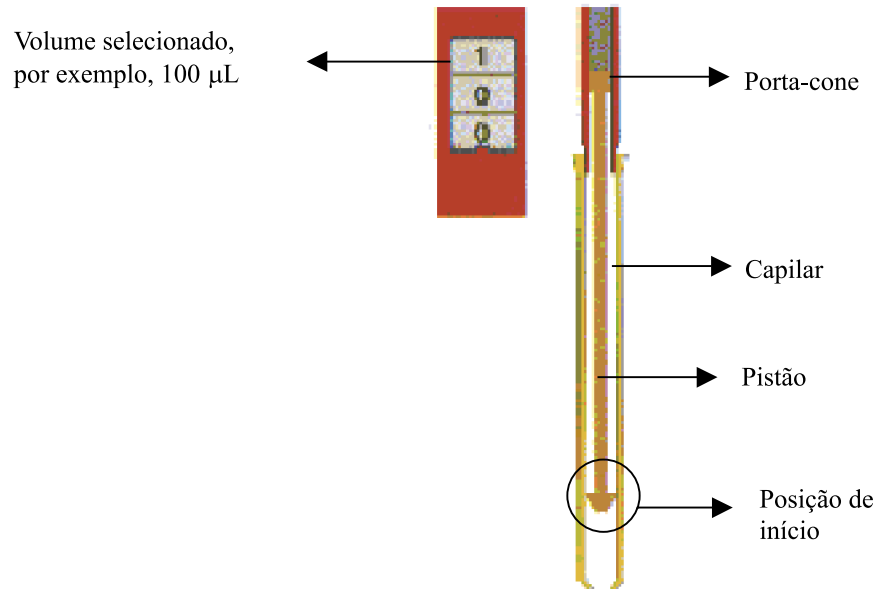
Em algumas pipetas de deslocamento de ar o pistão pode se deslocar um pouco abaixo do limite inferior (conseqüentemente deslocando uma quantidade adicional de ar) o que permite a expulsão das últimas gotas do líquido. O termo mais conhecido pelos usuários para este deslocamento adicional é “segundo estágio”.

**2.2. Pipetas de deslocamento positivo**

As pipetas de deslocamento positivo funcionam como uma seringa. Não há volume de ar entre o pistão e líquido. Como não há ar para contrair ou expandir, a força de aspiração é sempre constante e inalterada pelas propriedades físicas do líquido a ser manipulado. Este tipo de equipamento é ideal para a manipulação de líquidos viscosos ou de alta densidade.

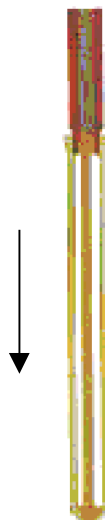
*a) Ajuste do volume*

O usuário ajusta o volume desejado. O pistão se move para baixo até a posição de início.



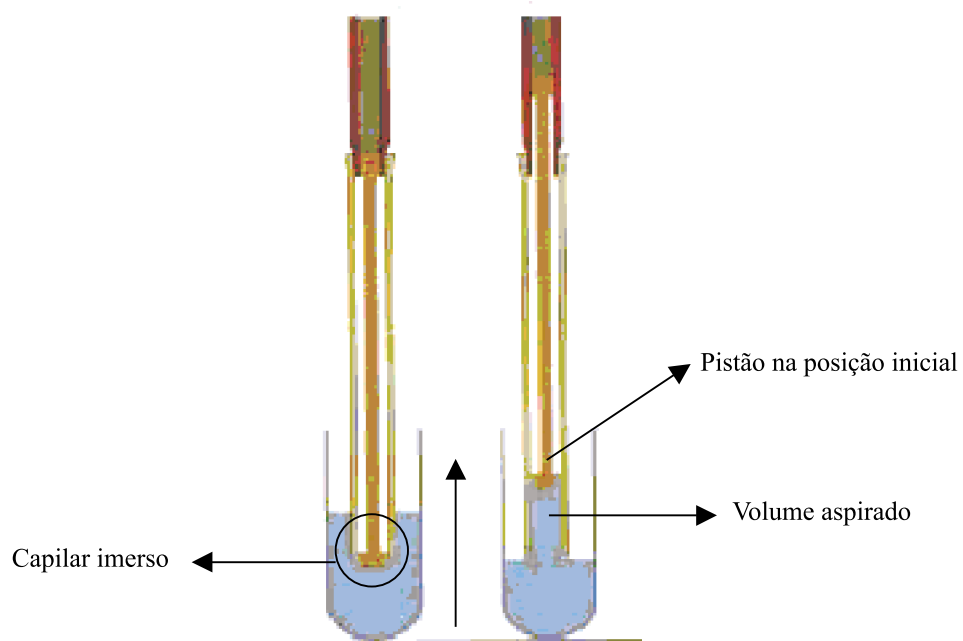
*b) Preparo para aspiração*

Pressiona-se o botão. O pistão desce até o final do capilar.



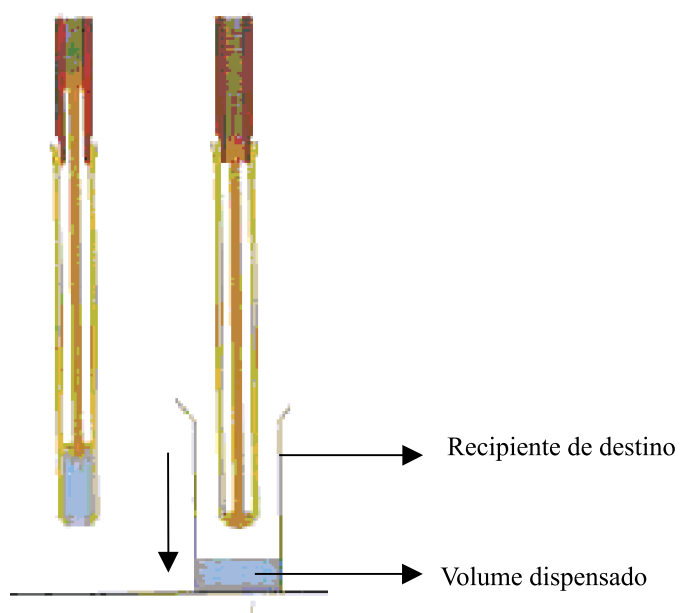
*c) Aspiração do líquido*

O orifício do capilar é imerso abaixo da superfície do líquido. Ao se liberar o botão, o pistão se move para cima e a pressão do ambiente força a entrada do líquido pelo orifício do capilar.



*d) Dispensa do líquido*

Pressiona-se novamente o botão. O pistão se move para baixo e expulsa o líquido para fora do capilar.





## 3. TÉCNICA DE OPERAÇÃO

Uma boa técnica de pipetagem é fundamental para garantir bons resultados. A seguir, um roteiro sobre alguns aspectos da técnica que devem ser considerados durante a operação.

### 3.1. Como guardar a pipeta

---

A pipeta deve ser guardada na posição vertical por dois motivos:

- Evita-se que ela entre em contato com superfícies que podem estar contaminadas, como por exemplo a bancada de trabalho (ao se deitar a pipeta sobre a bancada ou no interior de uma gaveta pode-se transferir para o corpo do instrumento contaminantes que estejam neste local e estes podem ser transferidos ao experimento, posteriormente).
- Se não for feita a ejeção da(s) ponteira(s) e houver sobrado uma quantidade residual do líquido no interior da(s) ponteira(s), ao se deitar a pipeta este líquido pode escorrer para o interior do instrumento contaminando e danificando as peças internas e/ou o porta-cone.

Exemplos de suportes:



### 3.2. Ajuste do volume

---

- Para evitar o erro de paralaxe, o ajuste do volume deve ser feito ou com a pipeta na posição horizontal. Caso o operador prefira ajustar o volume com a pipeta na posição vertical deve estar com um dos olhos fechado.
- Quando diminuir o volume, cuidadosamente chegue ao valor desejado e não ultrapasse a marca.
- Quando aumentar o volume, ultrapasse o valor desejado 1/3 de volta e depois, cuidadosamente, diminua o volume até chegar ao desejado, não ultrapassando a marca.

### 3.3. Encaixe da ponteira

---

- O encaixe da ponteira deve ser feito de acordo com as instruções do fabricante, garantindo a formação de um selo adequado entre a ponteira e o porta-cone da pipeta.

P.S: Entenda-se por selo um anel opaco que se forma ao redor de todo o colar da ponteira, indicando perfeita conexão entre o porta-cone e a ponteira. Um selo incompleto levará a resultados pouco precisos.

Abaixo, sugestões para o encaixe das ponteiras:

- Ponteiras soltas:

Segure a ponteira pelo colar (com cuidado para não tocar na ponta) e encaixe-a no porta-cone e a pressione contra ele com um movimento rotacional, como indicado na figura abaixo. Isto garante uma conexão perfeita entre a ponteira e o porta-cone (observe a formação do selo citado acima).



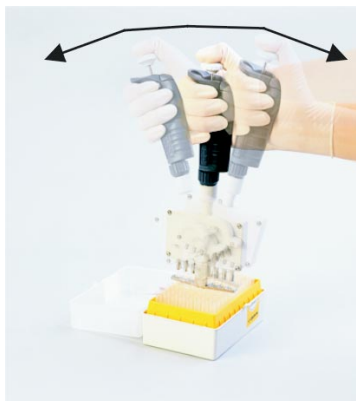
- Ponteiras em racks:

Encaixe o porta-cone na ponteira e pressione a pipeta para baixo com um movimento rotacional, como indicado na figura.



- Encaixe em multi-canal:

Para encaixar simultaneamente em todos os canais, posicione os porta-cones nos colares das ponteiros. Faça um movimento de vai e vem, como ilustrado na figura, o que assegura conexão adequada de todas as ponteiros em todos os canais.



### 3.4. Pré-rinsagem da ponteira

- Quando uma nova ponteira é colocada (ou aumenta-se o volume a ser aspirado), é necessário se fazer uma pré-rinsagem da ponteira. Para isso, basta aspirar e dispensar o líquido algumas vezes.
- A ação de pré-rinsar a nova ponteira garante a exatidão e precisão do volume a ser posteriormente transferido. Isto porque, quando se aspira um líquido, forma-se um filme na parede interna da ponteira. A natureza desse filme, que é o causador de erro na primeira medida, depende do líquido que está sendo transferido. Entretanto, este filme se mantém relativamente constante após algumas pipetagens com a mesma ponteira. É preciso pré-rinsar a ponteira para maximizar o desempenho da pipeta.

### 3.5. Aspiração

A aspiração deve ser feita de modo lento e constante, mantendo-se sempre a mesma profundidade de imersão da ponteira (durante a aspiração e entre uma amostra e outra). Recomenda-se que a profundidade de imersão seja em torno de 2 a 3 mm abaixo da superfície do líquido. Alguns fabricantes sugerem que a profundidade de imersão deve variar de acordo com o volume de trabalho, como discriminado na tabela abaixo:

Faixa de Volume	Profundidade recomendada
0.5 µL a 10 µL	≤ 1 mm
11 µl a 100 µL	2 – 3 mm
101µL a 1000 µL	2 – 4 mm
1001µL a 5000 µL	3 – 6 mm
5001 µL a 10 mL	5 – 7 mm

- A pipeta deve ser mantida na posição vertical durante toda a aspiração. Aguarde de 1 a 2 segundos antes de retirar a ponteira do líquido. Se do lado de fora da ponteira restarem gotículas do líquido, limpe-as usando papel macio (se a metodologia permitir). **Cuidado para não encostar no orifício da ponteira.**

### 3.6. Dispensa

---

- Encoste a ponta da ponteira na parede interna do recipiente e incline a pipeta aproximadamente 30° a 45°;
- Pressione o botão continuamente até o final do primeiro estágio. Aguarde alguns segundos (de 1 a 3 – dependendo da viscosidade do líquido) então pressione o botão até o segundo estágio (purga) para eliminar gotículas que possam ter permanecido na ponteira;
- Mantenha o botão pressionado até o final. Retire a pipeta de dentro do recipiente mantendo a ponteira em contato com a parede interna do recipiente (“arranhe” a ponta da ponteira na parede interna do recipiente).

### 3.7. Ejeção de ponteiras

---

- Descarte a ponteira pressionando o botão do ejetor de ponteiras;
- Deve-se tomar todas as precauções necessárias quando se trabalha com materiais contaminados e/ou radioativos. O procedimento adequado deve ser estabelecido pelo próprio laboratório de acordo com o tipo de material pipetado, considerando os aspectos de segurança do usuário e do local de trabalho.

## 4. PONTEIRAS

A qualidade dos resultados é diretamente influenciada pela qualidade da ponteira utilizada. Bons resultados exigem não só ponteiras de boa qualidade, mas também a mais adequada ao modelo e marca de pipeta utilizada.

### 4.1. Ponteiras para pipetas de deslocamento de ar

---

- O fabricante deve indicar qual marca de ponteira o usuário deve utilizar para alcançar as especificações indicadas no manual de operação da pipeta.
- As ponteiras de plástico para pipetas de deslocamento de ar devem ser utilizadas uma única vez. ***Não se deve limpar ou reutilizar estas ponteiras, pois suas características metrológicas não podem ser garantidas.***

### 4.2. Ponteiras para pipetas de deslocamento positivo

---

- O fabricante deve indicar qual marca de ponteira o usuário deve utilizar para alcançar as especificações indicadas no manual de operação da pipeta.
- O encaixe entre o pistão e o capilar deve ser ideal (selo perfeito entre capilar e pistão) assim como o deslocamento do pistão no interior do capilar o que garante dispensa por igual do líquido aspirado.
- Estas ponteiras podem ser reutilizadas ou descartáveis (ao se trocar a ponteira deve-se trocar simultaneamente o capilar e o pistão).

## 5. MANUTENÇÃO

Neste capítulo estaremos abordando três etapas fundamentais do procedimento de manutenção: limpeza, troca de peças e verificação da performance.

### OBSERVAÇÃO

É necessário fazer uma adequação entre as informações presentes neste capítulo e o manual de instruções do fabricante. Em particular devem ser observados os seguintes pontos:

- Verificar se as peças aqui relacionadas podem ser submetidas à lavagem;
- Procedimento de montagem e desmontagem da pipeta;
- Como trocar as peças danificadas;
- Verificar se qualquer um destes procedimentos altera a calibração da pipeta.

Se alterarem, é necessário realizar a verificação da performance do instrumento (vide anexo II) e eventual ajuste do equipamento (segundo instruções do fabricante).

### 5.1. Limpeza

É necessário criar uma rotina de limpeza e inspeção das peças da pipeta. Para que se possa obter sempre os melhores resultados, é necessário que as peças da pipeta estejam em boas condições de funcionamento. Existem duas situações distintas que exigem procedimentos de limpeza diferentes:

#### a) Limpeza “padrão”

Os aerossóis formados durante a pipetagem se depositam dentro da pipeta, prejudicando seu funcionamento normal. Este depósito pode, além de obstruir o orifício do porta-cone, prejudicando o deslocamento do ar dentro da pipeta, danificar as peças internas, como por exemplo o pistão (riscá-lo, corroê-lo). Nas duas situações, a pipeta vai operar fora das especificações.

Para evitar esta situação deve-se limpar as peças internas da pipeta (porta-cone, ejetor, pistão, selo e o-ring). Seguir o procedimento recomendado pelo fabricante. Um exemplo de procedimento de limpeza está descrito no anexo I.

***A limpeza é a principal ferramenta do usuário para prolongar a vida útil da pipeta e garantir resultados confiáveis. Não existe uma previsão da frequência de limpeza que deve ser adotada pelo laboratório (isto depende do tipo de material manuseado, rotina a que a pipeta é submetida, número de usuários para a mesma pipeta e erros admissíveis para o procedimento). Para garantir resultados confiáveis, a pipeta além de limpa freqüentemente deve ser submetida a testes de performance (anexo II).***

#### b) Pipeta utilizada na manipulação de materiais ácidos ou corrosivos

O estado do pistão interfere diretamente nas especificações da pipeta. Uma pipeta com pistão riscado ou corroído não atinge os padrões estabelecidos para exatidão e precisão. Materiais ácidos (como

por exemplo, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, fenol) ou corrosivos (como por exemplo hidróxido de sódio, solventes clorados) podem danificar o pistão. Pistão danificado leva a resultados não confiáveis.

Para se evitar danos ao pistão recomenda-se limpar as peças da pipeta logo após a manipulação deste tipo de líquido.

Ao contrário do procedimento descrito no item “a”, para esta limpeza não é necessário a utilização de um agente químico, basta utilizar água destilada.

- Desmonte a pipeta de acordo com as instruções do fabricante.
- Jogue água destilada sobre as seguintes peças: ejetor, porta-cone, pistão, selos do pistão.
- Deixe secar à temperatura ambiente ou em estufa até 40°.
- Monte a pipeta de acordo com instruções do fabricante.

## **OBSERVAÇÕES**

- Confirme se as peças em questão podem ser lavadas e se o procedimento afetará sua calibração (ou seja, se é necessário executar o procedimento de verificação da performance logo após a limpeza).
- O procedimento descrito no item “b” acima é particularmente indicado para pipetas com pistão metálico. Para pistões de outros materiais (vidro, plástico, cerâmica) é usual a presença de graxa de silicone para vedação do pistão, desta forma se recomenda verificar e seguir os procedimentos específicos contidos no manual.

## **5.2. Troca de peças**

---

Algumas peças da pipeta têm que ser trocadas periodicamente, pois sofrem desgaste e influenciam diretamente a performance da pipeta.

### **5.2.1. Selo(s) de vedação do pistão**

Esta(s) peça(s) faz(em) a vedação entre o pistão e o porta-cone (na parte superior). Devido ao uso, se formam microvilosidades na superfície destas peças e a vedação deixa de ser perfeita, levando a perda de precisão do instrumento. Esta(s) peça(s) deve(m) ser trocada(s) uma vez ao ano (consulte o procedimento para troca no manual do fabricante).

### **5.2.2. Porta-cone**

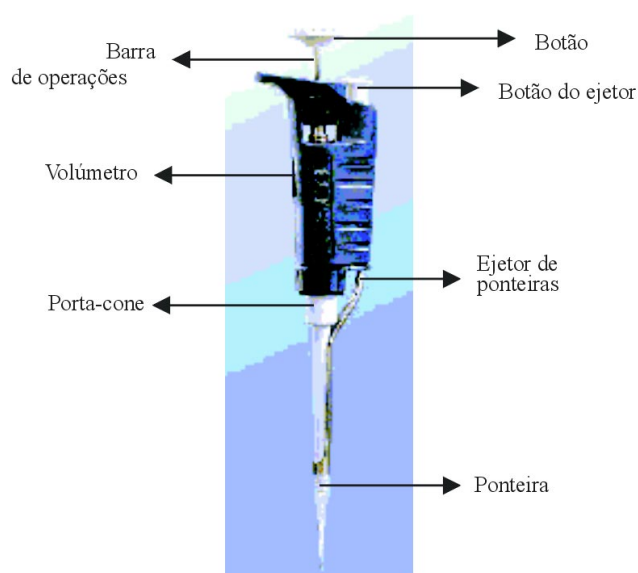
Outro ponto de vedação importante é a região de contato entre o porta-cone e a ponteira. Devido ao uso, ocorre desgaste da superfície do porta-cone na região de encaixe com a ponteira e o contato entre eles se torna deficiente, o que prejudica a medida (perda de precisão). A troca deve ser feita

sempre que se observar desgaste da região de encaixe com a ponteira ou danos na peça (quebra, lasca). Consultar o manual do fabricante para verificar se o procedimento afeta ou não a calibração do instrumento.

### 5.2.3. Outras peças

Outras peças influenciam na performance da pipeta. Abaixo, descrevemos um procedimento de verificação bastante simples que auxilia no reconhecimento de peças danificadas. Alguns procedimentos deverão ser realizados com base no manual do fabricante (por exemplo: desmontagem, montagem). Ressaltamos mais uma vez, a importância de se certificar se é ou não necessário recalibrar a pipeta após qualquer um destes procedimentos (esta informação se encontra no manual do fabricante).

#### 1ª ETAPA: APARÊNCIA GERAL



- Verifique se não há nenhum defeito aparente.

PEÇA	O QUE VERIFICAR	CAUSA
Barra de operações	Torta ou corroída	- Queda - Longa exposição a vapores corrosivos
Volúmetro	Desalinhamento e clareza dos números	- Autoclavagem afeta a aparência e a funcionalidade em algumas marcas e modelos
Ejetor de ponteiras	Corroído ou quebrado	- Longa exposição a vapores corrosivos
Porta-cone	Danos físicos ou químicos	- Pancadas - Longa exposição a vapores corrosivos - Desgaste natural devido ao uso



## 2ª ETAPA: TESTAR AS FUNÇÕES

- Gire o volúmetro totalmente, percorrendo toda a faixa volumétrica da pipeta. Verifique se o mínimo e o máximo volumes ajustáveis correspondem à real faixa volumétrica da pipeta.

*Problemas e causas:*

Ajuste impossível de ser feito	Pipeta autoclavada*
Ajuste de volume incorreto	Mau ajuste ou montagem incorreta do volúmetro

\* Algumas pipetas podem ser autoclavadas e outras não. Consulte o manual do fabricante.

- Com o volúmetro ajustado no valor máximo especificado para o modelo da pipeta, pressione o botão por todo o curso, para verificar a facilidade do movimento, sentindo eventuais obstáculos ou variações na fricção, o que pode revelar danos como corrosão no pistão ou barra de operações torta. Ouça o barulho da mola, o que pode indicar seu posicionamento incorreto.

*Problemas e causas:*

Movimento irregular	Anel de fricção danificado
Não deslocamento	Barra de operações torta
Movimento inadequado	Pistão corroído, sujo ou riscado

- Encaixe uma ponteira na pipeta e pressione o botão do ejetor de ponteiras, para verificar a eficácia da ejeção.

Sem movimento	Mecanismo de ejeção com problema
Encaixe indevido da ponteira	Ejetor não colocado corretamente
Difícil de retirar	Corrosão

## 3ª ETAPA: TESTE DO VAZAMENTO

Para pipetas que tenham um volume máximo maior do que 200 µl acerte seu volume no valor máximo e aspire água para encher a ponteira da pipeta. Observe a ponteira por 20 segundos. Se aparecer uma gota na ponta da ponteira, significa que há vazamento. Isto também é verdadeiro para pipetas com faixas de volume abaixo de 200µL, mas para esta faixa de volume se deve adotar o seguinte procedimento: após observar 20 segundos se há ou não formação de gota, mergulhe a ponta da ponteira no recipiente com água. O nível de água dentro da ponteira não deve ser alterado. Caso ele diminua, significa que há vazamentos.

A causa do vazamento pode ser:

- Selos do pistão danificados;
- Pistão riscado ou corroído;

- Danos químicos ou mecânicos no porta-cone, na região onde se encaixa a ponteira;
- Uso de ponteiras não recomendadas pelo fabricante (ver capítulo 4).

#### **4ª ETAPA: DESMONTAGEM**

Este processo deve ser adotado caso tenha ocorrido vazamento na etapa 3. Ao desmontar a pipeta pode-se avaliar as peças internas e chegar a uma conclusão sobre a causa do problema (pistão danificado, selos de vedação ausentes ou comprometidos, etc.) e definir quais peças devem ser trocadas. Abaixo, segue um exemplo de roteiro de desmontagem adotado para determinados modelos de pipetas. Não deixe de seguir as instruções do fabricante para desmontar a pipeta.

- Puxe para baixo e retire o ejetor de ponteiras (em alguns modelos o ejetor não é destacável);
- Retire a porca de conexão;
- Remova o pistão cuidadosamente;
- Verifique a superfície do pistão (se está corroída e/ou riscada) e os selos de vedação.

#### **5ª ETAPA: MONTAGEM**

Monte a pipeta segundo instruções do fabricante.

#### **OBSERVAÇÃO**

Recomendamos que as etapas de 1 a 3 sejam feitas diariamente antes do início dos trabalhos e registrados para controle do laboratório. Se forem constatadas anormalidades, se deve realizar as etapas 4 e 5.

Algumas peças podem ser trocadas pelo próprio usuário, sem comprometer a calibração do instrumento. Outras, após troca, exigem a verificação da calibração do instrumento e eventualmente ajustá-lo. Esta informação consta no manual de instruções da pipeta.

### **5.3. Verificação da performance**

---

Para garantir medidas confiáveis, além dos procedimentos de limpeza e trocas de peças, o usuário necessita verificar a performance da pipeta. Esta verificação analisa tanto a exatidão (erro sistemático) como a precisão (erro aleatório).

A verificação da performance, na realidade, avalia o conjunto pipeta + ponteira + operador (técnica de pipetagem). Para obtermos resultados confiáveis no teste, o operador deve ser treinado e qualificado (técnica de pipetagem descrita no capítulo 3) e as ponteiras devem ser as recomendadas pelo fabricante da pipeta.

O usuário deve estabelecer uma frequência de teste para suas pipetas, com base em: necessidades em termos de exatidão e precisão, frequência de uso, número de usuários para uma mesma pipeta, número de ciclos em cada utilização da pipeta e a natureza dos líquidos pipetados. No anexo II descrevemos o método gravimétrico para avaliação da performance das pipetas (referência: norma ISO/ FDIS 8655- Piston-operated volumetric apparatus - Part 6 - Gravimetric test methods).

## 6. SUGESTÕES DE PROCEDIMENTOS

- Pipetas operadas por pistão são equipamentos para aspirar e dispensar volumes específicos de líquidos.
- Para se assegurar a confiabilidade dos resultados, é necessário implantar a seguinte rotina:
  - Verificação da aparência geral, teste das funções e o teste do vazamento (etapas 1, 2 e 3) descritos no item 5.2.3. deste documento. Se forem constatadas anormalidades, realizar as etapas 4 e 5 do mesmo procedimento.
  - *Limpeza periódica das peças da pipeta*

A periodicidade da limpeza deve ser estabelecida de acordo com frequência de uso, número de usuários para uma mesma pipeta, número de ciclos em cada utilização da pipeta e a natureza dos líquidos pipetados. **Recomendamos aos laboratórios que realizem a limpeza a cada três meses** (se houve acúmulo de sujeira nestes três meses reduzir os intervalos entre uma limpeza e outra). É muito importante que o laboratório mantenha registros das limpezas realizadas o qual deve conter o número de série da pipeta, data da limpeza e o procedimento utilizado.
  - *Troca de peças*

**Os selos do pistão** devem ser trocados anualmente (se o número de pipetagens ultrapassarem 100.000, os selos devem ser trocados em um período de tempo menor que deve ser estimado a partir da rotina do laboratório). **O porta-cone** deve ser trocado a cada 2 anos ou quando a região de encaixe com a ponteira estiver desgastada. Estas trocas devem ser registradas (o registro deve conter o número de série da pipeta, a data da troca e os dados sobre a nova peça - lote ou número da nota fiscal de compra). Peças que afetem a performance da pipeta (por exemplo: pistão, volúmetro, haste) quando necessitarem de troca ou reparo, devem ser enviadas para assistência técnica especializada e este reparo deve ser devidamente registrado, além do registro da nova calibração da pipeta.
  - Verificar periodicamente a performance da pipeta (exatidão e precisão), conforme descrito no anexo II. Esta verificação deve ser feita a cada 3 meses e ser devidamente registrada (exemplo de registro no anexo II item 8.6.5. deste documento). Os erros máximos encontrados podem ser até 2 vezes maior do que os erros estabelecidos nas tabelas 1 e 2 deste documento (anexo II, item 8.6.4.). quando houver troca de peças que afetem a calibração da pipeta, o procedimento de verificação deve ser executado (veja item acima “troca de peças”).
  - *Teste do operador*

Como a técnica de operação é fundamental na obtenção de bons resultados, é necessário testar e registrar a técnica de pipetagem do operador. Para isso, com um equipamento que esteja operando dentro das especificações do fabricante, realize 10 medidas no volume máximo e mínimo especificado para aquele modelo de pipeta. Faça a análise da exatidão e precisão das medidas obtidas. Os erros máximos encontrados devem ser até 2 vezes os valores especificados nas tabelas 1 e 2 deste documento (anexo II, item 8.6.4.). Registre os dados em um relatório (exemplo no anexo II item 8.6.5.) identificando o operador que foi testado.

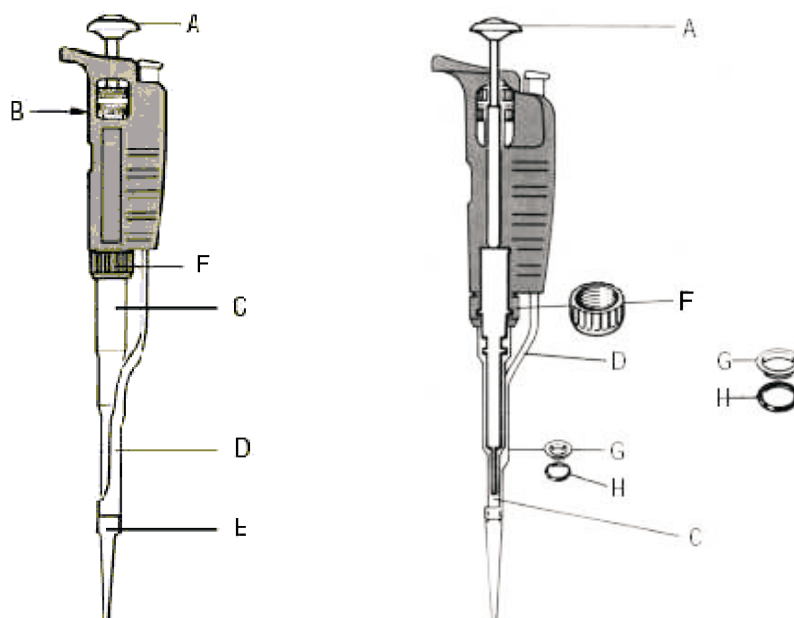
## 7. ANEXO I: EXEMPLO DE PROCEDIMENTO DE LIMPEZA

O exemplo a seguir pode ser utilizado por vários modelos de pipetas, em particular aquelas com o pistão metálico sem graxa; já para outros modelos será necessário adaptá-lo. Siga as instruções do fabricante contidas no manual do usuário. Não deixe de confirmar se as etapas descritas aqui não comprometem a calibração da pipeta.

**Atenção! Não misture as peças de uma pipeta com as peças de outra pipeta**

### 7.1. Desmontagem

É necessário que se desmonte a pipeta para fazer a limpeza (deve-se utilizar luvas quando houver risco de contaminação). Segue um esquema geral das peças das pipetas:



### RELAÇÃO DAS PEÇAS

Figuras 1 e 2

A	Botão
B	Handle
C	Porta-cone
D	Ejetor de ponteiros
E	Ponteira
F	Porca de conexão
G e H	Selos do pistão

*P.S. este esquema pode sofrer variações de acordo com o modelo e marca da pipeta. Para maiores detalhes consulte o manual do fabricante.*

- Retire o ejetor de ponteiros (D) puxando-o;
- Desconecte a porca de conexão (F) separando assim o corpo da pipeta (B) do porta-cone (C);
- Remova o conjunto do pistão cuidadosamente e separe os selos do pistão (G e H), mantendo o porta-cone com a parte mais fina para baixo.

Freqüentemente os selos do pistão ficam presos dentro do porta-cone. Para retirá-los deve-se recolocar o pistão, pressioná-lo contra o porta-cone, como se fosse fazer uma pipetagem. Retire o pistão que deverá trazer preso a ele, os selos.

## 7.2. Limpeza

---

- Coloque o porta-cone, o conjunto do pistão, ejetor de ponteiros, os selos (não colocar o handle) em um béquer, completando seu volume com solução de detergente neutro de 4% a 8% em água morna ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ );
- Coloque o béquer no banho de ultra-som e deixe aproximadamente 15 minutos (caso não tenha ultra-som, deixar na solução por 40 minutos);
- Descarte a solução de detergente utilizada;
- Lave cada peça com água corrente;
- Coloque as peças em um recipiente limpo e faça a última lavagem com água destilada;
- Seque na estufa a aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$  (não ultrapasse esta temperatura), durante no máximo 2 horas, ou deixe secar a temperatura ambiente.

## OBSERVAÇÕES

- Use solução de detergente neutro com concentração de 4% para limpeza de pipetas que apresentam pouca sujeira e concentração de 8% para limpeza de pipetas que apresentarem muita sujeira.
- Para as pipetas que após a lavagem continuarem apresentando algum tipo de sujeira, limpe com algodão umedecido com álcool isopropílico, tomando cuidado para não danificar o pistão.
- Sempre após o uso da pipeta com soluções ácidas e/ou corrosivas, lavar todas as peças com água destilada ou etanol.

## 7.3. Montagem

---

- Coloque o selo e o ring no pistão, encaixando em primeiro lugar o selo;
- Com uma das mãos, segure o corpo da pipeta na posição vertical e coloque o pistão;
- Encaixe o porta-cone no corpo da pipeta;
- Em seguida coloque e atarraxe a porca da conexão;
- Coloque o ejetor de ponteiros;
- A pipeta está pronta para uso.

## 8. ANEXO II: VERIFICAÇÃO PADRÃO DA PERFORMANCE

### 8.1. Considerações gerais

---

Este anexo descreve o procedimento para verificação da performance das pipetas utilizando-se o método gravimétrico (segundo norma ISO/ FDIS 8655 - Piston-operated volumetric apparatus - Part 6: Gravimetric tests). A utilização dos procedimentos descritos neste método garante conformidade com as especificações internacionais para exatidão e precisão.

O teste de conformidade para verificação da exatidão e precisão é aplicável a qualquer pipeta (definições no capítulo 1). Este teste, que está de acordo com padrões internacionais, analisa o sistema de pipetagem como um todo: pipeta, ponteira e operador.

O método descrito neste documento inclui um procedimento para correção das perdas por evaporação para pequenos volumes (abaixo de 50  $\mu\text{L}$ ). Também, na conversão para volume das massas obtidas na balança, são feitas correções referentes à temperatura e pressão no momento da execução do teste.

O usuário deve estabelecer uma rotina para testar suas pipetas com base em: necessidades em termos de exatidão e precisão, frequência de uso, número de usuários para uma mesma pipeta, número de ciclos em cada utilização da pipeta e a natureza dos líquidos pipetados. ***Não existe um intervalo padronizado entre uma checagem e outra. Cabe ao usuário definir este intervalo. A norma ISO/ FDIS 8655 define que a periodicidade mínima é de uma vez por ano.***

A pipeta deve ser desmontada e montada (de acordo com instruções no manual do fabricante) pelo menos uma vez antes de se realizar o teste de verificação. A pipeta deve ser operada de acordo com o manual do fabricante.

### 8.2. Condições ambientais da sala de teste

---

A sala de teste (laboratório) deve ser limpa e ter controle de temperatura e umidade para que as condições ambientais do local onde será feita a verificação e a temperatura dos equipamentos utilizados sejam estáveis e homogêneas antes e durante todo o procedimento.

A pipeta e a água utilizada no teste gravimétrico devem estabilizar na temperatura da sala de verificação pelo menos 2 horas antes do início do procedimento. Idealmente, a verificação deve ser feita nas seguintes condições:

- 1) Temperatura estável (água, pipeta e ambiente) entre 15° e 30°C;
- 2) Umidade Relativa acima de 50%.

### **8.3. Operador**

---

#### **8.3.1. Operação da pipeta**

Um procedimento adequado de pipetagem contribui significativamente para a reprodutibilidade dos resultados no teste de verificação. Operadores sem experiência podem ter variações importantes nos resultados. Para resultados confiáveis, o operador deve ser bem treinado e qualificado. Os aspectos da técnica de pipetagem foram discutidos no capítulo 3.

#### **8.3.2. Treinamento**

O teste de conformidade deve ser feito por um operador qualificado. Se necessário, contate uma empresa especializada para solicitar treinamento ao operador.

### **8.4. Ponteiras**

---

A pipeta que será testada deve ser operada segundo as instruções fornecidas pelo manual de operação. Novamente, com base no manual de operação que acompanha a pipeta que será testada, tenha certeza, antes de começar o teste, que ela está limpa, montada corretamente e de estar utilizando as ponteiras recomendadas pelo fabricante.

Consulte o capítulo 4 para maiores detalhes.

### **8.5. Equipamentos utilizados no teste**

---

Para garantir a integridade do procedimento de verificação, todos os equipamentos utilizados durante o procedimento devem ser verificados regularmente.

#### **8.5.1. Balança**

As balanças devem ser calibradas e certificadas por pessoal qualificado usando pesos rastreáveis a autoridades reconhecidas nacionalmente (Empresas/ Instituições credenciadas pelo INMETRO e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração - RBC).

A legibilidade da balança deve ser escolhida de acordo com o volume selecionado na pipeta que está sendo testada.

Volume selecionado na pipeta sob teste	Legibilidade (mg)	Repetibilidade e linearidade (mg)	Incerteza de medição padrão (mg)
de 1µL a 10µL	0,001	0,002	0,02
> 10µL a 100µL	0,01	0,02	0,02
> 100 µL a 1000µL	0,1	0,2	0,2
> 1 mL a 10 mL	0,1	0,2	0,2
> 10 mL a 200 mL	1	2	2

*Em termos práticos, o volume nominal (maior volume selecionável pelo usuário) pode ser utilizado para a escolha da balança*

### 8.5.2. Outros equipamentos

- Termômetro: incerteza de medição máxima de 0,2°C
- Higrômetro: incerteza de medição máxima de 10%
- Barômetro: incerteza de medição máxima de 0,5 kPa

### 8.5.3. Recipientes

Recipientes que serão utilizados durante o procedimento:

- Recipiente de origem  
É o recipiente que contém a água que será utilizada para a realização das medidas (o volume deste recipiente deve ser suficiente para a execução de TODAS as medidas).
- Recipiente para pesagem  
É o recipiente que será utilizado para a realização da medida (é o que será colocado no prato de pesagem da balança).
- Recipiente de descarte  
É um terceiro recipiente que recolherá as alíquotas que não serão pesadas.

Recomenda-se que, especialmente para o teste do menor volume da pipeta, a proporção média entre o diâmetro e a altura do recipiente para pesagem seja 3:1 ou que o recipiente tenha tampa. Algumas empresas fornecem kits de recipientes adequados à realização do teste gravimétrico.

### 8.5.4. Água

No teste, utiliza-se água destilada ou deionizada, nos dois casos deve ser degaseificada (água grau 3 conforme a Norma ISO 3696) à temperatura da sala onde será feita a verificação. Para evitar flutuações



na temperatura da água, use um recipiente de origem que seja suficientemente grande, pois este deve conter água suficiente para a realização de todas as medidas.

## 8.6. O procedimento de verificação

---

A verificação da performance analisa tanto a exatidão (erro sistemático) como a precisão (erro aleatório). Condições, procedimentos e qualificações previamente descritas neste documento devem ser implantados para garantir a validade dos resultados dos testes.

Após rinsar a ponteira, faça 10 pesagens\* individuais para cada volume selecionado. Para as pipetas de volume variável, três volumes diferentes devem ser selecionados de acordo com a faixa de volume do modelo que está sendo avaliado. Estes volumes devem ser o volume nominal (máximo), 50% do volume nominal (volume intermediário) e o volume mínimo da faixa de volume do modelo (estes volumes estão definidos no manual da pipeta). Para as pipetas de volume fixo utiliza-se apenas o volume nominal.

1. Ajuste na pipeta o volume do teste (este deve ser mantido durante todo o procedimento).
2. Estime a taxa de evaporação (para volumes pequenos, menores do que 50µL). Vide a seguir o procedimento.
3. Faça o teste de verificação: registre as massas no Relatório de Verificação de Performance.
4. Faça os cálculos: registre os resultados no Relatório de Verificação de Performance.
5. Compare os resultados com as especificações de exatidão e precisão que estão relacionadas nas tabelas 1 e 2 (item 8.6.4).

Estas etapas serão detalhadas adiante.

### 8.6.1. Estimando a taxa de evaporação (massa média evaporada por ciclo de pesagem)

Para volumes abaixo de 50µL é necessário o uso de um recipiente com tampa. O objetivo é minimizar, controlar e quantificar a perda por evaporação durante o ciclo de pesagem. O uso de pinças para a manipulação deste recipiente também é aconselhável.

A evaporação pode ser estimada, realizando-se uma série de quatro simulações de pesagens, na qual se repete o ciclo de pesagem sem que haja dispensa de água no recipiente para pesagem. A diferença total atribuída à evaporação é calculada e dividida por 4, para se obter uma média. A faixa é expressa em mg/ciclo (ou se for um único ciclo, deve ser expresso em mg). Evite manipular excessivamente o recipiente. O uso de pinças para manipular o recipiente para pesagem é aconselhável.

As taxas de evaporação geralmente estão entre 0,010 mg e 0,025 mg por ciclo de pesagem. Recalcule a taxa de evaporação sempre que as condições ambientais forem alteradas (temperatura, pressão e umidade).

---

\* O usuário pode selecionar o número de medidas de acordo com as especificações de exatidão e precisão aceitas pela sua metodologia.

1. Adicione água ao recipiente para pesagem até que este esteja com 1/3 do seu volume cheio.
2. Coloque o recipiente tampado no prato da balança.
3. Com a pipeta, aspire a alíquota do recipiente de origem.
4. Tare a balança e remova o recipiente para pesagem do prato da balança (o uso de pinças para removê-lo é aconselhável).
5. Dispense a alíquota no recipiente de descarte ou retorne-a para o recipiente de origem. Não a dispense no recipiente para pesagem.
6. Registre o resultado  $e_1$ .
7. Repita as etapas de 3 a 8, três vezes para obter  $e_2, e_3$  e  $e_4$ .
8. Calcule a perda/ ciclo:  $\bar{e} = (e_1 + e_2 + e_3 + e_4)/4$  (mg).
9. A evaporação por ciclo  $\bar{e}$  (mg) deve ser adicionada ao peso médio antes do cálculo do volume médio.

Um exemplo de cálculo da taxa de evaporação é dado ao final deste capítulo

### 8.6.2. Teste gravimétrico

As técnicas de aspiração e dispensa estão descritas no capítulo 3. Embora vários métodos alternativos de pipetagem sejam possíveis, sempre utilize o modo normal (modo direto, não utilizar o modo reverso). Para todas as pipetas, evite segurar ou esquentar o porta-cone com a mão durante o teste.

Para pipetas multi-canal, encaixe as ponteiros em todos os canais, mas teste um canal por vez. E registre os resultados para cada canal.

#### 1. Preparação

- 1.1. Coloque água do recipiente de origem no recipiente para pesagem a uma profundidade de, no mínimo, 3 mm.
- 1.2. Meça e registre a temperatura da água do recipiente de origem ( $t_1$ ), a pressão do ar e a umidade relativa da sala. Se o recipiente para pesagem possui tampa, coloque-a.
- 1.3. Encaixe uma nova ponteira.
- 1.4. Selecione e ajuste o volume que será testado (este não deverá ser alterado durante o teste).
- 1.5. Pré-rinse a ponteira, aspirando a alíquota do recipiente de origem e dispensando no recipiente de descarte 5 vezes, para equilibrar a umidade do ar dentro da atmosfera da pipeta.
- 1.6. Coloque o recipiente para pesagem com água no prato da balança e tare-a ( $m_0 = 0$ ).

#### 2. Ciclo do teste

Cada ciclo do teste deve demorar menos de 1 minuto. Entretanto, um ritmo constante durante a operação de pesagem deve ser mantido (o ritmo do ciclo e entre os ciclos).

- 2.1. Encaixe uma nova ponteira na pipeta.
- 2.2. Pré-rinse a ponteira aspirando e dispensando no recipiente de descarte uma vez.
- 2.3. Aspire, como especificado no capítulo 3, o volume a ser testado.

- 2.4. Se o recipiente para pesagem possuir tampa, remova-a.
- 2.5. Dispense o volume testado no recipiente para pesagem e recoloque a tampa com o auxílio da pinça.
- 2.6. Registre a massa  $m_1$  do volume testado.
- 2.7. Tare a balança.

**3. Repita o teste descrito acima (do item 2.1 ao 2.7) até completar 10 medidas ( $m_1$  a  $m_{10}$ ).**

**4. Após a última medida, verifique e registre a temperatura da água do recipiente de origem ( $t_2$ ), a pressão atmosférica e a umidade relativa da sala.**

### 8.6.3. Cálculos

#### 1. Cálculo da temperatura média

Calcule a temperatura média ( $t$ ) da água destilada (a variação máxima entre  $t_1$  e  $t_2$ : 0,2°C)

$$t = (t_1 + t_2) / 2$$

#### 2. Cálculo da pressão média

Use a pressão barométrica média ( $B$ ) e a temperatura média ( $t$ ) para determinar o Fator-Z correspondente na tabela.

$$B = (B_1 + B_2) / 2$$

#### 3. Cálculo do volume a partir da massa

Multiplique as massas (mg), depois das correções das perdas por evaporação (para volumes abaixo de 50  $\mu\text{L}$ ) pelo fator Z para obter os volumes ( $\mu\text{L}$ ).

$$V_i = Z (m_i + e)$$

$V_i$  = volumes individuais ( $\mu\text{L}$ )

$m_i$  = massas individuais (mg)

$\bar{e}$  = taxa de evaporação (mg)

Z = fator Z ( $\mu\text{L} / \text{mg}$ )

#### 4. Cálculo do volume médio

Após calcular o volume individual das pesagens, calcule o volume médio (resultado expresso em  $\mu\text{L}$ ).

$$\bar{V} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n V_i$$

$V_i$  = Volumes individuais

$\bar{V}$  = volume médio

n = número de pesagens

### 5. Exatidão (erro sistemático)

Diferença entre o volume médio do teste e o volume ajustado na pipeta. Para pipetas de volume fixo, substitua  $V_s$  por  $V_o$  = volume nominal. A exatidão pode ser expressa em mL ou...

...como porcentagem:

$$e_s = \bar{V} - V_s$$

$e_s$  = erro médio

$\bar{V}$  = volume médio

$V_s$  = volume ajustado

$$e_s = 100\% (\bar{V} - V_s) / V_s$$

### 6. Precisão (erro aleatório)

Dispersão dos volumes dispensados ao redor da média dos volumes dispensados. Também conhecida (de acordo com o contexto) como desvio padrão, reprodutibilidade ou repetibilidade.

$$DP = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(V_i - \bar{V})^2}{n-1}}$$

$V_i$  = volumes individuais

$\bar{V}$  = volume médio (calculado como no item anterior)

$n$  = número de medidas

DP = desvio padrão

Como porcentagem, também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$CV = (DP / \bar{V}) \times 100\%$$

**Cálculos: fator Z**

Z = fator de conversão (mL/ mg),  $t$  (°C) = média da temperatura\*, B = pressão atmosférica (hPa)

<b>B (hPa)</b>	<b>800</b>	<b>853</b>	<b>907</b>	<b>960</b>	<b>1013</b>	<b>1067</b>
<b>t (°C)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>	<b>Z (µl/mg)</b>
<b>15.0</b>	1.0018	1.0018	1.0019	1.0019	1.0020	1.0020
<b>15.5</b>	1.0018	1.0019	1.0019	1.0020	1.0020	1.0021
<b>16.0</b>	1.0019	1.0020	1.0020	1.0021	1.0021	1.0022
<b>16.5</b>	1.0020	1.0020	1.0021	1.0022	1.0022	1.0023
<b>17.0</b>	1.0021	1.0021	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023
<b>17.5</b>	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023	1.0024	1.0024
<b>18.0</b>	1.0022	1.0023	1.0024	1.0024	1.0025	1.0025
<b>18.5</b>	1.0023	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0026
<b>19.0</b>	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0027	1.0027
<b>19.5</b>	1.0025	1.0026	1.0026	1.0027	1.0028	1.0028
<b>20.0</b>	1.0026	1.0027	1.0027	1.0028	1.0029	1.0029
<b>20.5</b>	1.0027	1.0028	1.0028	1.0029	1.0030	1.0030
<b>21.0</b>	1.0028	1.0029	1.0030	1.0030	1.0031	1.0031
<b>21.5</b>	1.0030	1.0030	1.0031	1.0031	1.0032	1.0032
<b>22.0</b>	1.0031	1.0031	1.0032	1.0032	1.0033	1.0033
<b>22.5</b>	1.0032	1.0032	1.0033	1.0033	1.0034	1.0035
<b>23.0</b>	1.0033	1.0033	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036
<b>23.5</b>	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036	1.0036	1.0037
<b>24.0</b>	1.0035	1.0036	1.0036	1.0037	1.0038	1.0038
<b>24.5</b>	1.0037	1.0037	1.0038	1.0038	1.0039	1.0039
<b>25.0</b>	1.0038	1.0038	1.0039	1.0039	1.0040	1.0041
<b>25.5</b>	1.0039	1.0040	1.0040	1.0041	1.0041	1.0042
<b>26.0</b>	1.0040	1.0041	1.0042	1.0042	1.0043	1.0043
<b>26.5</b>	1.0042	1.0042	1.0043	1.0043	1.0044	1.0045
<b>27.0</b>	1.0043	1.0044	1.0044	1.0045	1.0045	1.0046
<b>27.5</b>	1.0044	1.0045	1.0046	1.0046	1.0047	1.0047
<b>28.0</b>	1.0046	1.0046	1.0047	1.0048	1.0048	1.0049
<b>28.5</b>	1.0047	1.0048	1.0048	1.0049	1.0050	1.0050
<b>29.0</b>	1.0049	1.0049	1.0050	1.0050	1.0051	1.0052
<b>29.5</b>	1.0050	1.0051	1.0051	1.0052	1.0052	1.0053
<b>30.0</b>	1.0052	1.0052	1.0053	1.0053	1.0054	1.0055

\* esta média é obtida a partir do valor da temperatura da água do recipiente de origem medida no início do teste ( $t_1$ ) e da temperatura da água do recipiente de origem medida ao final do teste ( $t_2$ ).

### 8.6.4. Especificações

**TABELA 1**

- Esta tabela de especificações se aplica às pipetas de deslocamento de ar de volume fixo e para pipetas de deslocamento positivo que utilizem capilares e pistões reutilizáveis.
- Esta tabela também pode ser utilizada para as pipetas de deslocamento de ar de volume variável. O volume nominal nestas pipetas é o maior volume selecionável pelo usuário e especificado pelo fabricante. Por exemplo: uma pipeta com a faixa de volume especificada de 10  $\mu\text{L}$  a 100  $\mu\text{L}$ , o volume nominal é 100  $\mu\text{L}$ . Os erros máximos aceitáveis para o volume nominal se aplicam a todos os volumes da faixa especificada: se considerarmos uma pipeta com uma faixa de volume de 10  $\mu\text{L}$  a 100  $\mu\text{L}$ , o erro sistemático máximo aceitável para qualquer volume selecionado é de 0,8  $\mu\text{L}$  e o erro aleatório máximo aceitável para qualquer volume selecionado é de 0,3  $\mu\text{L}$ .

Volume Nominal $\mu\text{L}$	Erros permissíveis máximos (sistemático)		Erros permissíveis máximos (aleatório)	
	$\pm \%$	$\pm \mu\text{L}$	$\pm \%$	$\pm \mu\text{L}$
1	5,0	0,05	5,0	0,05
2	4,0	0,08	2,0	0,04
5	2,5	0,125	1,5	0,075
10	1,2	0,12	0,8	0,08
20	1,0	0,2	0,5	0,1
50	1,0	0,5	0,4	0,2
100	0,8	0,8	0,3 <sup>d</sup>	0,3 <sup>d</sup>
200	0,8	1,6	0,3 <sup>d</sup>	0,6 <sup>d</sup>
500	0,8	4,0	0,3	1,5
1000	0,8	8,0	0,3	3,0
2000	0,8	16	0,3	6,0
5000	0,8	40	0,3	15,0
10000	0,6	60	0,3	30,0

*Para volumes intermediários aos relacionadas na tabela, o valor absoluto dos erros máximos aceitáveis do volume imediatamente maior se aplicam. Por exemplo: para determinar os erros máximos aceitáveis para 25  $\mu\text{L}$ , usa-se os valores especificados para 50  $\mu\text{L}$ .*

**TABELA 2**

Esta tabela de especificações se aplica às pipetas de deslocamento positivo que utilizem capilares e pistões reutilizáveis e/ ou com volume fixo.

Volume Nominal μL	Erros permissíveis máximos (sistemático)		Erros permissíveis máximos (aleatório)	
	± %	± μL	± %	± μL
5	2,5	0,13	1,5	0,08
10	2,0	0,2	1,0	0,1
20	2,0	0,4	0,8	0,16
50	1,4	0,7	0,6	0,3
100	1,5	1,5	0,6	0,6
200	1,5	3,0	0,4	0,8
500	1,2	6,0	0,4	2,0
1000	1,2	12,0	0,4	4,0

*Para volumes intermediários aos relacionadas na tabela, o valor absoluto dos erros máximos aceitáveis do volume imediatamente maior se aplicam.*

## OBSERVAÇÕES

- O usuário pode definir os erros máximos aceitáveis (sistemático e randômico) com base na sua metodologia.
- O usuário deve testar seu equipamento regularmente, como por exemplo, a cada três meses. Outros intervalos de tempo entre os testes podem ser estabelecidos (desde que não ultrapasse um ano) com base nos seguintes aspectos: frequência de uso, número de usuários da pipeta, natureza agressiva do material transferido, os erros máximos aceitos pelo usuário.
- Quando o teste for feito após manutenção ou reparo do equipamento, os erros máximos aceitáveis (sistemático e aleatório) devem obedecer às tabelas relacionadas neste documento (tabela 1 e 2).

### 8.6.5. Relatório do procedimento de verificação

Após o teste, é necessário que as informações sejam registradas. Anexamos um modelo de relatório, mas o usuário pode elaborar o seu próprio modelo, desde que este contenha as seguintes informações:

- Identificação da pipeta;
- Data;
- Condições do teste (temperatura, pressão, umidade relativa);
- As medidas obtidas para cada volume testado;
- Os resultados dos cálculos;
- Resultado da comparação com a tabela de especificação.

### MODELO:

#### Identificação da pipeta

Modelo Número de série Ponteiras utilizadas no teste

#### Identificação do técnico

Empresa Nome Tel/Email

Técnico Nome Tel/Email

#### Condições

Data/ Hora do teste Localização

Temperatura (°C) Umidade (%) Pressão (hPa)

#### Balança

Modelo Número de série Sensitividade

### Resultados do teste

Volume

Pesagem 1

Pesagem 2

Pesagem 3

Pesagem 4

Pesagem 5

Pesagem 6

Pesagem 7

Pesagem 8

Pesagem 9

Pesagem 10

Volume médio

( $\bar{V}$ ,  $\mu\text{L}$ )

Exatidão ( $\bar{V} - V_o$ )

Exatidão (%)

Precisão (DP)

Precisão (CV, %)

	$m_i$ (mg)	$V_i$ ( $\mu\text{L}$ )

	$m_i$ (mg)	$V_i$ ( $\mu\text{L}$ )

	$m_i$ (mg)	$V_i$ ( $\mu\text{L}$ )

COMPARADO COM AS ESPECIFICAÇÕES:

**APROVADA**

**REPROVADA**



### 8.6.6. Exemplo numérico de verificação da performance

Vamos colocar um exemplo com os cálculos que devem ser feitos na verificação da performance. Tomaremos como base a verificação hipotética de 10 µL em um pipeta de deslocamento de ar de volume variável.

1. Como o volume testado é menor do que 50 µL, a taxa de evaporação deve ser determinada (item 8.6.1.).

Número de medidas: 04 ( $e_1, e_2, e_3, e_4$ )

Taxa de evaporação média:  $\bar{e}$

$$e_1 = 0.016 \quad e_3 = 0.021$$

$$e_2 = 0.018 \quad e_4 = 0.017$$

$$\bar{e} = (e_1 + e_2 + e_3 + e_4) / 4 \text{ (mg)}$$

$$\bar{e} = (0.016 + 0.018 + 0.021 + 0.017) / 4$$

$$\bar{e} = 0.018 \text{ mg/ por ciclo}$$

2. Registra-se a temperatura e a pressão inicial do teste:

$$T_i = 21.5^\circ\text{C}$$

$$P_i = 1013$$

3. Realiza-se 10 medidas (item 8.6.2.) e os valores são registrados.

$$W_1 = 9,84$$

$$W_6 = 9,90$$

$$W_2 = 9,90$$

$$W_7 = 9,92$$

$$W_3 = 9,91$$

$$W_8 = 9,93$$

$$W_4 = 9,86$$

$$W_9 = 9,95$$

$$W_5 = 9,87$$

$$W_{10} = 9,92$$

4. Registra-se a temperatura e a pressão final do teste:

$$T_f = 21,5^\circ\text{C}$$

$$P_f = 1013$$

5. Cálculo da pressão e temperatura média:

$$\bar{T} = (T_i + T_f) / 2$$

$$\bar{P} = (P_i + P_f) / 2$$

$$\bar{T} = (21,5 + 21,5) / 2$$

$$\bar{P} = (1013 + 1013) / 2$$

$$\bar{T} = 21,5^\circ\text{C}$$

$$\bar{P} = 1013$$

Estes valores de temperatura e pressão médios serão utilizados na determinação do fator de conversão Z.

6. Conversão da massa para volume:

$$V_i = (W_i + \bar{e}) \times Z$$

Para uma temperatura de 21.5°C e uma pressão atmosférica de 1013 hPa o fator Z é igual a 1.0032  $\mu\text{L}/\text{mg}$ .

Massa (mg)	Volume ( $\mu\text{L}$ )
W1 = 9,84	V1 = 9,89
W2 = 9,90	V2 = 9,95
W3 = 9,91	V3 = 9,96
W4 = 9,86	V4 = 9,91
W5 = 9,87	V5 = 9,92
W6 = 9,90	V6 = 9,95
W7 = 9,92	V7 = 9,97
W8 = 9,93	V8 = 9,98
W9 = 9,95	V9 = 10,00
W10 = 9,92	V10 = 9,97

7. Cálculo do volume médio

$$\bar{V} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n V_i$$

$$\bar{V} = (9,89 + 9,95 + 9,96 + 9,91 + 9,92 + 9,95 + 9,97 + 9,98 + 10,00 + 9,97)/10$$

$$\bar{V} = 9,95 \mu\text{L}$$

8. Análise da exatidão

– Erro sistemático - E

$$E = \bar{V} - V_0$$

$V_0$  é o valor ajustado na pipeta (volume nominal). Neste exemplo equivale a 10 $\mu\text{L}$ .

$$E = 9,95 - 10$$

$$E = - 0,05 \mu\text{L}$$

– Erro relativo - E%

$$E\% = (\bar{V} - V_0) \times 100 / V_0$$

$$E\% = (-0,05 \times 100) / 10$$

$$E\% = - 0,50 \%$$

9. Análise da precisão (repetibilidade - erro aleatório)

– Desvio padrão - DP

$$DP = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(V_i - \bar{V})^2}{n-1}} \Rightarrow DP^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(V_i - \bar{V})^2}{n-1}$$

$$DP_v^2 = 1/9 \times [(9,89 - 9,95)^2 + (9,95 - 9,95)^2 + (9,96 - 9,95)^2 + (9,91 - 9,95)^2 + (9,92 - 9,95)^2 + (9,95 - 9,95)^2 + (9,97 - 9,95)^2 + (9,98 - 9,95)^2 + (10,00 - 9,95)^2 + (9,97 - 9,95)^2 + ]$$

$$DP_v = 0,03 \mu\text{L}$$

– Coeficiente de variação – CV

$$CV = (DP / \bar{V}) \times 100\%$$

$$CV = (0,03 / 9,95) \times 100\%$$

$$CV = 0,34 \%$$

10. Colocamos os resultados no relatório (item 8.6.5.)

Volume	10 $\mu\text{L}$	
	$m_i$ (mg)	$V_i$ ( $\mu\text{L}$ )
<b>Pesagem 1</b>	9,84	9,89
<b>Pesagem 2</b>	9,90	9,95
<b>Pesagem 3</b>	9,91	9,96
<b>Pesagem 4</b>	9,86	9,91
<b>Pesagem 5</b>	9,87	9,92
<b>Pesagem 6</b>	9,90	9,95
<b>Pesagem 7</b>	9,92	9,97
<b>Pesagem 8</b>	9,93	9,98
<b>Pesagem 9</b>	9,95	10,00
<b>Pesagem 10</b>	9,92	9,97
<b>Volume médio</b>	<b>9,95</b>	
<b>(V, <math>\mu\text{L}</math>)</b>		
<b>Exatidão ( <math>\bar{V} - V_0</math> )</b>	<b>- 0,05</b>	
<b>Exatidão (%)</b>	<b>- 0,51</b>	
<b>Precisão (DP)</b>	<b>0,03</b>	
<b>Precisão (CV, %)</b>	<b>0,34</b>	

Na tabela 1 (item 8.6.4.) temos as seguintes especificações para 10  $\mu\text{L}$  (tabela 1):

Volume Nominal $\mu\text{L}$	Erros permissíveis máximos (sistemático)		Erros permissíveis máximos (aleatório)	
	$\pm \%$	$\pm \mu\text{L}$	$\pm \%$	$\pm \mu\text{L}$
10	1.2	0.12	0.8	0.08

É só comparar os resultados obtidos (relatório) com o especificado na tabela. Neste caso, a pipeta testada está aprovada.

## 9. ANEXO III: PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Os procedimentos descritos a seguir podem ser utilizados para alguns modelos de pipetas, em particular aquelas com pistão metálico. Por isso é necessário consultar as instruções do fabricante antes de aplicar qualquer um dos métodos descritos aqui.

### INTRODUÇÃO

Neste documento, estão descritas uma série de métodos para descontaminação da pipeta, especialmente as de pistão metálico. Estes métodos podem ser físicos (autoclavagem ou irradiação UV) ou químicos. De acordo com o tipo de utilização da pipeta, deve-se escolher o método de descontaminação mais eficiente.

Entretanto, considerando o espectro de ação, as vantagens e desvantagens destes métodos, concluímos que o método mais eficiente é a descontaminação química.

Soluções químicas comerciais, compostas tanto de detergentes como de desinfetantes, garantem uma descontaminação eficiente.

Como o método de descontaminação química é eficiente, rápido e fácil de realizar, o recomendamos para os procedimentos de descontaminação de rotina.

#### ***Procedimento de descontaminação***

Os tipos de contaminação podem ser: da amostra para o operador, de uma amostra para outra ou da amostra para a pipeta. Isto pode afetar a segurança do operador, da amostra e conseqüentemente o resultado do experimento ou, finalmente, a pipeta.

Existem muitos métodos para eliminar contaminantes, mas existem algumas dúvidas em relação a sua eficiência e sua compatibilidade com as pipetas.

Neste documento procuramos esclarecer as dúvidas relacionadas ao processo de descontaminação, considerando a variedade de aplicações das pipetas. Assim, diferentes campos de aplicação serão comentados (química, microbiologia e biologia molecular), e métodos químicos ou físicos serão discutidos. A eficiência do método pode ser explicada através do seu mecanismo de ação. Quando mais de um método for proposto, será feita uma comparação entre eles para auxiliar na escolha do mais adequado. Após a escolha do método de descontaminação, consulte os protocolos no final deste capítulo.

## Campo de aplicação

### 9.1. Química

---

Simplesmente lavando as pipetas com água destilada, as contaminações por ácidos, bases, tampões ou solventes orgânicos são eliminadas.

Pode haver necessidade de remoção de outros produtos, tais como óleos e graxas. Então, é necessário utilizar detergentes. Detergentes (surfactantes aniônicos) são moléculas orgânicas com uma extremidade polar, hidrofílica e outra não polar, hidrofóbica. Devido a sua estrutura eles tornam resíduos insolúveis (graxa, por exemplo) em solúveis, sendo, portanto, agentes de limpeza eficientes.

#### 9.1.1. Procedimento de limpeza padrão *(maiores detalhes consultar anexo I)*

Este procedimento deve ser utilizado para eliminar os contaminantes provenientes do uso da pipeta (por exemplo: proteínas e tampões) e que não requerem tratamento especial para serem eliminados, tais como microorganismos, radiatividade e outros, abordados adiante.

- Retire o ejetor de ponteiros puxando-o;
- Desconecte a porca de conexão separando assim o corpo da pipeta do porta-cone;
- Remova o conjunto do pistão cuidadosamente e separe o(s) selo(s), mantendo o porta-cone com a parte mais fina para baixo;
- Coloque o porta-cone, o conjunto do pistão, o ejetor de ponteiros, o(s) selo(s) em um béquer (não colocar o corpo da pipeta), completando seu volume com solução de detergente de 4% a 8% em água morna ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ );
- Coloque o béquer no banho de ultra-som e deixe aproximadamente 15 minutos (caso não tenha ultra-som, deixar na solução por 40 minutos);
- Descarte a solução de detergente utilizada.

Freqüentemente, o(s) selo(s) ficam presos dentro do porta-cone. Para retirá-los deve-se recolocar o pistão, pressioná-lo contra o porta-cone, como se fosse fazer uma pipetagem. Retire o pistão que deverá trazer preso a ele o(s) selo(s).

- Coloque as peças em um recipiente limpo e faça a última lavagem com água destilada;
- Seque na estufa a aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$  (não ultrapasse esta temperatura), durante no máximo 2 horas, ou deixe secar à temperatura ambiente.

### OBSERVAÇÕES

- Use solução de detergente com concentração de 4% para limpeza de pipetas que apresentam pouca sujeira e concentração de 8% para limpeza de pipetas que apresentarem muita sujeira.
- Para as pipetas que após a lavagem continuarem apresentando algum tipo de sujeira, limpe com algodão umedecido com álcool isopropílico, tomando cuidado para não danificar o pistão.

- Sempre após o uso da pipeta com soluções ácidas e/ou corrosivas, lavar todas as peças com água destilada ou etanol.
- Monte a pipeta.

## 9.2. Microbiologia e cultura celular

Nestes campos, é necessária a eliminação de uma série de microorganismos (por exemplo: vírus, bactérias e/ou fungos, assim como leveduras).

Várias técnicas, com diferentes espectros e mecanismos de ação, podem ser utilizadas.

### 9.2.1. Autoclavagem

A característica do ciclo de esterilização depende da quantidade inicial de microorganismos (a chamada carga microbiana). Geralmente, aceita-se que a chance de um organismo viável estar presente em um item autoclavado é menor do que 1 em 1 milhão (Nível de Garantia de Esterilidade de  $10^{-6}$ ).

<b>Alvos</b>	Qualquer célula vegetativa e endosporos <sup>19</sup> . A cinética que leva a inativação dos vírus ainda não está esclarecida <sup>9</sup> .
<b>Ação</b>	O calor degrada os ácidos nucléicos, enzimas e outras proteínas essenciais. Podem ocorrer danos a membrana celular.

### 9.2.2. Irradiação UV

O comprimento de onda UV está entre 100 nm e 400 nm. Existem 3 tipos de radiação UV, de acordo com o comprimento de onda: UVC (200 nm a 290 nm), UVB (290 nm a 320 nm) e UVA (320 nm a 400nm).

<b>Alvos</b>	Letal para a maioria dos microorganismos <sup>19</sup> (Tabela §2.1)
<b>Ação</b>	Alterações fotoquímicas nas enzimas celulares (UVA) e DNA (UVC) - veja detalhes na tabela § 1.3.2.

### 9.2.3. Agentes químicos

A escolha da solução química deve ser feita considerando-se o tipo de microorganismo que se quer eliminar.

Na tabela a seguir, estão relacionados os principais microorganismos e alguns agentes químicos comuns. No caso de manipulação de cepas especiais, deve-se considerar produtos comerciais específicos para destruí-los, e ter certeza da compatibilidade química da pipeta com o respectivo produto químico (veja § 3.3).

Agente Químico	Bactéria		Micobactérias	Esporos	Fungos	Vírus	Células
	Gram +	Gram -					
Hipoclorito de sódio	+++	+++	++	++	++	++	+++
Glutaraldeído	+++	+++	++	+	+++	++	+++
Etanol 70%	++	++	++	+	+	+	++
Sal de amônio quaternário	+++	+	-	-	+	+	-

Nível de atividade: +++: forte, ++: médio, +: fraco, -: sem atividade.

Os mecanismos de ação destes agentes químicos estão descritos na tabela a seguir:

Agente químico	Ação
Hipoclorito de sódio	Oxida componentes celulares.
Glutaraldeído	Alquila e inativa proteínas.
Etanol 70%	Parece dissolver lipídios da membrana. Denatura proteínas.
Sal de amônio quaternário	Danifica a membrana do microorganismo. Denatura proteínas.

### 9.3. Biologia molecular

Os bioquímicos e biólogos moleculares estão familiarizados com as fontes de contaminação como proteases, ácido nucléico contaminantes (DNA, RNA), nucleases (RNases, DNases) e radioatividade.

#### 9.3.1. Proteases

Proteases são enzimas que degradam proteínas. Vários métodos de descontaminação e seus mecanismos de ação estão detalhados na tabela a seguir:

Método/ Agente químico	Ação
Autoclavagem	O calor denatura as enzimas e outras proteínas essenciais. Oxidação de proteínas.
Hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Rompe pontes dissulfeto e outras ligações das proteínas.
Glutaraldeído	Rompe a estrutura das proteínas.
Álcoois	Rompe as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas.
Ácidos e álcalis	Rompe as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas. Desequilíbrio do balanço de cargas.

### 9.3.2. Ácidos nucleicos (DNA e RNA)

A especificidade e a sensibilidade das técnicas de PCR e RT-PCR possuem uma desvantagem: fácil contaminação dos reagentes e das amostras, causando erros sistemáticos<sup>7</sup>.

Método/ Agente químico	Ação
Autoclavagem	Os ácidos nucleicos são degradados a moléculas de pesos moleculares menores <sup>1,10</sup> .
Irradiação UV	Danos aos ácidos nucleicos: cross-linking de pirimidinas adjacentes na mesma fita (base timina em particular). As bases do dímero deixam de formar pares ligados por pontes de hidrogênio, deixando de servir como primers ou templates para a síntese dos ácidos nucleicos. Resultado: - Processo de reparo em excesso. - Falha do processo de replicação <sup>9</sup> .
Hipoclorito de sódio	O hipoclorito de sódio reage de maneira inespecífica com os ácidos nucleicos <sup>9</sup> . As bases e os nucleotídeos livres são destruídos (algumas vezes formam-se derivados clorados), ocorrendo desestabilização e quebra da hélice do DNA.
Glutaraldeído	Rompe a estrutura dos ácidos nucleicos. Alquila os ácidos nucleicos.

Outro método:

Glicina/ Tampão HCl (pH=2). A ação desta solução não é documentada (veja protocolo mais adiante)

*Nota:* todos estes métodos degradam os ácidos nucleicos a moléculas de pesos moleculares menores, que não são normalmente amplificadas; entretanto, estes métodos não limpam.



### 9.3.3. Nucleases

Nucleases são enzimas que degradam ácidos nucleicos. Possuem uma larga distribuição, sendo encontradas em células procarióticas e eucarióticas, vegetais e animais (na pele, na água). As DNases não são muito resistentes, não sendo muito críticas para a maioria das aplicações em biologia molecular, enquanto que as RNases são mais duráveis e resistentes ao calor.

As DNases requerem íons metálicos para sua atividade e podem ser inativadas facilmente com alguns tampões apropriados (com agentes quelantes como EDTA). As RNases não precisam de íons metálicos, pois utilizam o grupo 2-hidroxil como reativo, não sendo, portanto, fáceis de inativar.

Método/ Agente químico	Ação
Autoclavagem	Nem sempre suficiente para inativar as RNases, que pode recuperar sua atividade após várias formas de tratamento (fervura, por exemplo).
Irradiação UV	Sem dados na literatura.
DEPC (dietil pirocarbonato)	Alquila resíduos de histidina dos sítios catalíticos das RNases A, inativando-as. É forte, mas não é um inibidor absoluto.

### 9.3.4. Comentários sobre os ácidos nucleicos e nucleases

Todos os métodos mencionados degradam parcialmente os ácidos nucleicos e as nucleases, mas nenhum se mostrou 100% eficiente.

A melhor maneira de evitar contaminação em biologia molecular é ter alguns cuidados:

- Separe áreas e conjuntos de pipetas para a preparação da amostra e para condução dos ensaios.
- Use ponteiros com filtro para evitar a contaminação por aerossóis.
- Ou, ainda melhor, utilize pipetas de deslocamento positivo com capilares e pistões descartáveis (proteção total contra contaminação cruzada). Para protocolos críticos de PCR, a utilização das pipetas de deslocamento positivo é requerida quando não pode haver contaminação.

### 9.3.5. Radioatividade

Para contaminação radioativa fraca, detergentes específicos contendo agentes complexantes podem ser utilizados.

## Comparação dos métodos

Os métodos são comparados considerando primeiramente a sua eficiência em relação ao contaminante, e depois as vantagens e desvantagens.

### 9.4. Espectro de ação dos métodos

Considere duas abordagens:

1. Eu tenho os materiais necessários para realizar este método no meu laboratório. O quanto ele é efetivo (leia a tabela verticalmente)?
2. Eu preciso eliminar este contaminante. O que posso fazer (leia a tabela horizontalmente)?

Contaminantes	Métodos							
	Físicos		Químicos					
	Autoclavagem	Irradiação UV	Água	Detergente	Amônio Quaternário	Hipoclorito de sódio	Glutaraldeído	Etanol 70%
Ácidos, bases,	-	-	++	-	-	-	-	-
Óleos, graxas	-	-	-	++	-	-	-	++
Bactérias Gram +	+++	+	-	-	+++	+++	+++	++
Bactérias Gram -	+++	+	-	-	+	+++	+++	++
Micobactérias	SI	+	-	-	-	++	++	++
Esporos	+++	+	-	-	-	++	+	+
Fungos	+++	+	-	-	+	++	+++	+
Vírus	+++	+	-	-	+	++	++	+
Células	+++	+	-	-	-	+++	+++	++
Proteases	+	+	-	+	+	+	+	+
Ácidos Nucléicos	++	+	-	-	-	++	+	-
RNases	+	+	-	-	-	+	-	-
Radiatividade	-	-	-	++*	-	-	-	-

Nível de atividade: +++: forte, ++: médio, +: fraco, -: sem atividade, SI: sem informação.

\*: detergentes específicos (com agentes complexantes).

Para irradiação UV: +: alguma atividade, -: nenhuma atividade.

O limite de atividade da irradiação UV é difícil de avaliar, já que sua ação não depende apenas do comprimento de onda (entre 100 nm e 400 nm), mas também de outros fatores, como: tempo de exposição, distância da lâmpada, densidade de emissão, ângulo de exposição e temperatura atmosférica.

### 9.5. Vantagens e desvantagens

Consulte a tabela a seguir. O método deve preencher os seguintes requisitos:

- Compatibilidade com os materiais de fabricação da pipeta.
- Ação rápida.
- Fácil e seguro de realizar.

Método	Vantagens	Desvantagens
Autoclavagem	Aparelhagem comum	Mata, mas não limpa, sendo necessário outro procedimento para limpeza. Estágio de secagem após o término do ciclo. Tempo de espera para estabilização à temperatura ambiente. Não é eficiente para todos os microorganismos.
Irradiação UV	Fácil e rápido	Mata, mas não limpa, sendo necessário outro procedimento para limpeza. Penetração baixa (apenas descontaminação externa). Porta-cone pode ficar amarelado *. Degradação de alguns tipos de materiais plásticos (PMP). Danifica os ácidos nucleicos, mas tem seu efeito desconhecido sobre as RNases.
Agentes químicos	Fácil Baixo custo Abrange toda pipeta	Tóxico quando utilizado em grandes concentrações. Algumas vezes, irritante (DEPC é carcinogênico). Estágio de secagem após término do ciclo.

\* Aqueles feitos de PVDF. Porta-cone resistente à radiação UV (feitos de PBT) estão disponíveis para P200 e P1000.

Assim sendo, os procedimentos químicos podem ser considerados como os mais aplicáveis para a descontaminação das pipetas.

## Protocolos

De acordo com o método utilizado, diferentes partes da pipeta podem ser descontaminadas.

Método	Parte da pipeta
Autoclavagem	Porta-cone, porca de conexão, ejetor de ponteiros.
Irradiação UV	Partes externas.
Soluções químicas	Diferentes níveis, dependendo da solução utilizada (partes externas, imersão completa).

*Nota:* Use luvas descartáveis durante todo o procedimento de descontaminação.

### 9.6. Autoclavagem

Remova o ejetor de ponteiros e desrosqueie a porca de conexão. Limpe o porta-cone, a porca de conexão e o ejetor de ponteiros com um detergente e depois autoclave por 20 min a 121°C, 0,1 Mpa. Deixe as peças secarem ou coloque-as na estufa a 50 - 60°C por aproximadamente 30min.

*Nota:* – Não autoclave estas peças a 134°C, pois isto irá danificar as peças.

- Não autoclave nenhuma outra peça, além das relacionadas acima.

### 9.7. Irradiação UV

Lâmpadas UV podem ser instaladas no alto da bancada ou em uma capela de biossegurança, onde as manipulações podem ser realizadas. A combinação de bulbos de 254 nm e 300 nm durante 20 min pode destruir DNA dupla fita (seqüências longas são mais fáceis de inativar)<sup>7</sup>.

### 9.8. Soluções químicas

Antes de utilizar uma solução química, tenha certeza da compatibilidade com materiais utilizados na fabricação das pipetas. O fabricante deve fornecer uma lista dos materiais utilizados na fabricação da pipeta. Abaixo alguns exemplos:

PVDF, PBT, PC, PE, POM, borracha nitrílica, aço inoxidável, ABS, PEI e PMP. Veja o “Glossário e Abreviações”.

*Nota:* não é aconselhável embeber o selo e o o’ring.

### 9.8.1. Descontaminação do porta-cone, ejetor de ponteiros e porca de conexão

Seguem dois exemplos de soluções químicas e seus protocolos.

#### *Hipoclorito de sódio*

O Hipoclorito de sódio possui uma larga atividade antimicrobiana, ação antibactericida rápida e também denatura proteases, DNA e RNA. Além disso, é um agente químico fácil de utilizar, não é tóxico nas concentrações utilizadas e possui baixo custo.

É muito importante limpar a pipeta (com um detergente, como por exemplo Mucapur) antes de realizar a desinfecção com hipoclorito de sódio, pois o método pode perder sua eficiência na presença de altas concentrações de material orgânico.

- Limpeza
  - Remova o ejetor de ponteiros, desrosqueie a porca de conexão e remova o pistão do porta-cone.
  - Dilua o detergente com água quente a 50-60°C em:
    - a) Um banho de ultra-som  
ou em
    - b) Um béquer.
  - Coloque o porta-cone, o ejetor de ponteiros e a porca de conexão:
    - a) No banho de ultra-som por 15 min .  
ou
    - b) No béquer - as peças devem ser escovadas.
  - Retire as peças e enxágue bem.

Antes de descartar a solução de limpeza, adicione hipoclorito de sódio 10% à solução e deixe agir por 10 minutos. Este procedimento é para que a solução de limpeza seja descontaminada antes de entrar em contato com a rede de água local.

- Desinfecção
  - Dilua o hipoclorito de sódio em água destilada a uma concentração de 10% e coloque em um béquer grande.
  - Coloque o porta-cone, ejetor de ponteiros e porca de conexão no béquer e deixe agir por 30 min.
  - Enxágue muito bem, primeiramente com água corrente da torneira, e depois, com água destilada.
  - Deixe secar a 50°C - 60°C por aproximadamente 30 min.
  - Deixe em temperatura ambiente por 15 min antes de montar a pipeta (para que as peças resfriem antes da montagem da pipeta).

**Nota:** a solução de hipoclorito deve ser descartada após 3 dias.

### ***Glicina/ Tampão HCl (pH2=2)***

Prepare a solução da seguinte maneira:

Tampão 10x: 30,6g de NaCl; 39,2g de glicina, completar com água destilada até o volume de 523 ml. Adicione HCl 1N em quantidade suficiente para um volume final de 1000mL.

- Remova o ejetor de ponteiros, desrosqueie a porca de conexão e remova o pistão do porta-cone.
- Coloque o porta-cone, a porca de conexão e o ejetor de ponteiros no tampão diluído 1x (diluição 1/10 do tampão descrito previamente) a 95°C por 30 min.
- Enxágue muito bem, primeiramente com água corrente de torneira e depois com água destilada.
- Deixe secar a 50°C - 60°C por 30 min.
- Deixe em temperatura ambiente por 15 min antes de montar a pipeta.

### **9.8.2. Descontaminação da parte inferior e do corpo da pipeta**

Para a maioria das aplicações, a descontaminação da parte inferior e do corpo da pipeta é suficiente.

Uma mistura de agentes químicos é recomendada (detergente e desinfetante em um único produto).

O corpo da pipeta deve ser limpo com uma solução compatível (veja item 3.3) apenas na sua superfície (não mergulhe o corpo da pipeta na solução descontaminante). A parte inferior da pipeta, que inclui pistão, ejetor de ponteiros, porta-cone e porca de conexão (com exceção dos selos do pistão) também devem ser limpos (utilizando-se escovas pequenas para limpar a parte interna do porta-cone) ou podem ser imersos seguindo o procedimentos seguir:

- Remova o ejetor de ponteiros, desrosqueie a porca de conexão e remova o pistão do porta-cone.
- Dilua o agente químico selecionado (de acordo com as instruções do fabricante) em um béquer.
- Coloque as partes inferiores (pistão, ejetor de ponteiros, porta-cone e porca de conexão) desmontadas no béquer.
- Enxágue muito bem, primeiramente com água corrente de torneira e depois, com água destilada.
- Seque a 50 °C - 60 °C por 30 min.
- Deixe as peças em temperatura ambiente por 15 min antes de montar a pipeta.

### **Conclusão**

O método de descontaminação da pipeta é selecionado de acordo com seu tipo de aplicação. Descontaminar completamente as peças inferiores e limpar o corpo com a solução de escolha é suficiente para a maioria das aplicações (veja § 3.3.2).

## Apêndice 1

E os materiais descartáveis (ponteiras, capilares e pistões e as Distritips)?  
Métodos utilizados para esterilização dos consumíveis plásticos das pipetas

No laboratório, a autoclavagem é o método mais comum para a esterilização das ponteiras. Entretanto, este processo leva tempo: o tempo da autoclavagem em si, o ciclo de secagem e a estabilização em temperatura ambiente por algumas horas.

**Nota:** o processo de autoclavagem deve ser feito a 121°C (20 min, 1 MPa). Não é recomendado realizar a autoclavagem a 134 °C , pois isto pode danificar os plásticos.

Dependendo do tipo de material, outros métodos são utilizados pelo fabricante para deixar os consumíveis esterilizados: óxido de etileno ou, mais frequentemente, irradiação (raios gama:<sup>60</sup>Co, ou raios beta: feixe de elétrons).

Como o processo de fabricação é automatizado, até, inclusive o estágio final, são normalmente produzidas ponteiras “limpas”, sem nenhum contato manual.

Método	Ação
Óxido de etileno	Alquila o amino terminal dos aminoácidos resultando em morte celular <sup>11</sup> .
Irradiação	Ionização de componentes celulares importantes (incluindo aminoácidos) <sup>11</sup> . Inativação de templates de DNA através de radicais livres.

### Comentários

O óxido de etileno é altamente tóxico e mutagênico. Portanto, seu uso tem sido muito questionado por autoridades de saúde e de controle ambiental em muitos países.

A irradiação usada nos processos industriais para esterilização não deixa os materiais radioativos. A escolha da dosagem é baseada em determinações experimentais regulares.

## Apêndice 2

### *Pirogênicos*

A contaminação por pirogênicos pode ser preocupante em alguns procedimentos farmacêuticos, nos quais aparelhos médicos são utilizados para preparações parenterais (mencionado em inúmeros métodos da Pharmacopéia)<sup>4</sup>.

Pirógenos são endotoxinas produzidas por bactérias Gram negativas, e são química e fisicamente estáveis. Muito pouco tem sido publicado sobre como eliminá-los.

A utilização de raios gama em altos níveis de energia (mínimo de 25 kGy) parece eliminar os riscos da contaminação por pirogênicos. Em outras palavras, para que um produto possa ser certificado como ‘livre de pirogênicos’, ele tem que ser fabricado e controlado como um equipamento médico.

## 10. ANEXO IV: DEFINIÇÕES

**Exatidão (erro médio ou erro sistemático):** diferença entre o volume dispensado e o volume nominal ou o volume selecionado na pipeta.

**Calibração:** conjunto de operações que estabelecem a relação entre o volume dispensado e o volume nominal ou selecionado correspondente na pipeta.

**Volume morto de ar:** nas pipetas de deslocamento de ar, é o volume de ar entre a parte inferior do pistão e a superfície do líquido.

**Taxa de evaporação:** estimativa da perda de água causada pela evaporação durante o processo de pesagem.

**Análise gravimétrica:** procedimento geral baseado na determinação da massa das alíquotas de água dispensadas por uma pipeta. Os valores são corrigidos com relação à perda por evaporação, e então, a massa real e o volume são calculados, com base na densidade da água em temperaturas específicas com correções para a pressão atmosférica do local (fator Z).

**Volume nominal:** maior volume selecionável pelo usuário e especificado pelo fabricante.

*Nota: isto significa que, para uma pipeta de volume variável com uma faixa de volume útil de 10µl a 100µl, o seu volume nominal é 100µl.*

**Volume selecionado:** volume ajustado pelo usuário, para a dispensa do volume escolhido dentro da faixa de volume útil.

*Nota: para as pipetas de volume fixo, o volume selecionado é igual ao volume nominal.*

**Precisão (erro aleatório):** dispersão dos volumes dispensados ao redor da média dos volumes dispensados. Também conhecida (de acordo com o contexto) como desvio padrão, reprodutibilidade ou repetibilidade.

*Repetibilidade:* é a dispersão entre os resultados de medidas sucessivas (realizadas em um curto espaço de tempo), onde não há alteração dos parâmetros nem das condições.

*Reprodutibilidade:* é a dispersão entre os resultados de medidas realizadas em condições diferentes (local ou operador diferente), mantendo todos os parâmetros constantes.

**Especificações volumétricas (erros máximos admissíveis):** são os extremos permitidos (superior e inferior) para o desvio entre o volume dispensado e o volume nominal ou o volume selecionado.

**Faixa de volume útil:** parte do volume nominal que pode ser dispensado, dentro do erro máximo especificado na Norma Internacional ISO/ DIS 8655. O valor superior da faixa de volume útil é sempre o volume nominal. O valor inferior é 10% do volume nominal, se não estiver especificado de forma diferente pelo fabricante.

**Recalibração (ajuste feito pelo operador):** é um procedimento definido pelo fabricante e que pode ser executado pelo usuário final, para garantir que a pipeta opere conforme as especificações publicadas.

**Pesagem:** pesar significa determinar a massa de uma alíquota.

**Fator Z:** fator de conversão (µL/mg) considerando-se a densidade da água em contato com o ar, em função da temperatura e da pressão.

**Ex:** Designação (abreviatura) de um instrumento projetado para dispensar volumes.

**In:** Designação (abreviatura) de um instrumento projetado para aspirar volumes.



## 11. GLOSSÁRIO E ABREVIACÕES

### Glossário

*Detergente*: moléculas orgânicas que tornam solúveis resíduos insolúveis (óleos e gorduras). São agentes de limpeza eficientes (a maioria não elimina microorganismos).

*Descontaminação*: desinfecção de artigos infectados permitindo sua manipulação/ uso (redução dos microorganismos para um nível aceitável).

**Nota**: a descontaminação química implica em um processo prévio de limpeza com um detergente para que o processo de descontaminação possa ser eficiente.

*Desinfecção*: eliminação seletiva de alguns tipos de microorganismos para prevenir a sua transmissão (redução do número de microorganismos infectantes abaixo do nível necessário para causar uma infecção).

*Esterilização*: eliminação completa de todos os organismos (por exemplo: células, esporos e vírus).

### Abreviações

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etileno DiaminoTetraacético

RNA: Ácido Ribonucleico

### Materiais

ABS: Estireno Butadieno Acrilonitrila

PBT: PoliButileno Tereftalato

PC: PoliCarbonato

PE: PoliEtileno

PEI: Imida Polieter

PMP: PoliMetilPenteno

POM: PoliOxiMetileno

PP: PoliPropileno

PVDF: Fluoreto de PoliViniliDeno

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J.E. and Isaacs, S.T. 1990. 'Post PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction'. *Nucleic Acids Research*, 19 (1): 99-107.
- Deragon, J.M., Sinnet, D., Mitchell, G., Potier, M., Labuda, D. 1990. 'Use of  $\gamma$  irradiation to eliminate DNA contamination for PCR'. *Nucleic acids research*, 18 (20): 6149.
- Ferron, A.. 1992. 'Spectre d'activité des antiseptiques et désinfectants'. Bactériologie médicale (à l'usage des étudiants en médecine), *Edition C et R*.
- Gilson Guide to Pipetting 800353A
- prEN ISO/ FDIS 8655-1 - Piston-operated volumetric apparatus
- Guyomard, S., Goury, V., Laizier, J., Darbord, J.C. 'Defining of the pyrogenic assurances level (PAL) of irradiated medical devices'. 1987. *International Journal of Pharmaceutics*, 40: 173-174.
- Hanne, A., Krupp, G.. 'Removing DNA contamination from pipettes'. *Bionews, Eppendorf*, No.8.
- Hayatsu, H., Pan, S.K, and Ukita, T. 1971. 'Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents'. *Chem. Pharm. Bull*, 19 (10) 2189-2192.
- Heinrich, M. 1991. 'PCR carry-over'. *BFE*, 8 (10): 594-597.
- Jette, L.P., Ringuette, L., Ishak, M., Limmer, M. and Saint-Antoine, P. 1995. 'Evaluation of three glutaraldehyde-based disinfectants used in endoscopy'. *J Hosp Infect*, 30 (4): 295-303.
- Jürgen, H. and Kaiser, K. 1996. 'Avoiding viral contamination in biotechnological and pharmaceutical processes'. *Nature Biotechnology*, 16: 1077-1079.
- Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. 'Avoiding false positives with PCR'. *Nature*, 339: 237-238.
- Leuci, C. 1998. 'Intérêt des EVC dans le secteur biomédical'. *Caoutchoucs et plastiques*. 769.
- Manual de operação da Pipetman P - marca Gilson LT801117
- Miffittin, T.E. 'Control of contamination'. *Molecular Bio-Products*.
- Ou, Chin-Yih, Moore, J.L, and Schochetman, G. 1991. 'Use of UV irradiation to reduce false positivity in Polymerase Chain Reaction'. *BioTechniques*, 10 (4): 442.
- Part 1: terminology, general \*
- prEN ISO/ FDIS 8655-2 - Piston-operated volumetric apparatus
- Part 2: pipettes \*
- prEN ISO/ FDIS 8655-6 - Piston-operated volumetric apparatus
- Part 6: Gravimetric test methods \*
- Prince, A.M. and Andrus, L. 1992. 'PCR: how to kill unwanted DNA'. *BioTechniques*, 12 (3): 358-360.
- Sambrook, Fritsch, and Maniatis. 1989. 'In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction'. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. 14:14.
- Taibi, C. 'L'infection existe, sa prévention aussi'. *Guide pratique d'hygiène hospitalière*.

Tritt, C.S. 1997. 'Sterilization methods'. <http://www.msoe.edu/~tritt/be4xx/stermeth.html>.

Van Bueren, J., Simpson, R.A., Salman, H., Farelly, H.D. and Cookson, B.D. 1995. 'Inactivation of HIV-1 by chemical disinfectants: sodium hypochlorite'. *Epidemiol Infect*, 115 (3): 567-579.

'Le contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques'. *Partie 4, chapitre 5: le contrôle des micro-organismes*.

'Extraction and purification of RNA'. *Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells* (7.3-7.5).

Sterilization and sterility assurance of compendial articles, USPXXI. *Sterilization and sterility assurance, general information*.

'Avoiding Ribonuclease contamination'. *'neb.com'*.



# Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume II

## Módulo 2: Água para Análises Químicas

**Volume II – Módulo 2 – Água para Análises Químicas Instrumentais**

**Editor:**

- José Muradian Filho - Millipore

**Coordenação:**

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva - ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla - ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira - ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira - ANVISA
- Max Weber Marques Pereira - ANVISA
- Renato Almeida Lopes - ANVISA

<b>1. ÁGUA PARA ANÁLISES QUÍMICAS INSTRUMENTAIS</b> .....	5
1.1. Introdução .....	5
1.2. Os contaminantes da água .....	5
1.2.1. Compostos inorgânicos dissolvidos .....	6
1.2.2. Compostos orgânicos dissolvidos .....	6
1.2.3. Partículas e colóides .....	6
1.2.4. Microorganismos .....	7
1.2.5. Gases dissolvidos .....	7
1.3. Monitoramento e controle da qualidade da água purificada .....	7
1.3.1. Monitoração de contaminantes iônicos inorgânicos – condutividade e resistividade .....	8
1.3.2. Monitoração de contaminantes orgânicos – TOC ou COT – carbono oxidável total .....	10
1.4. Especificações de qualidade .....	11
1.5. Tecnologias de purificação de água para laboratórios .....	12
1.5.1. Destilação .....	12
1.5.2. Deionização .....	13
1.5.3. Osmose reversa .....	14
1.5.4. Eletrodeionização contínua .....	16
1.5.5. Ultrafiltração .....	18
1.5.6. Microfiltração em membrana .....	19
1.5.7. Carvão ativado .....	20
1.5.8. Radiação ultravioleta (UV) .....	20
<b>2. ESPECIFICAÇÕES PARA ÁGUA PURIFICADA</b> .....	23
2.1. Objetivo .....	23
2.2. Monitoramento da qualidade dos diversos tipos de água .....	24
2.3. Calibração e qualificação .....	24
2.4. Recomendações de armazenagem .....	25
2.5. Manutenção dos equipamentos de purificação de água .....	25
2.6. Formulários de controle .....	25
2.7. Documentos de referência .....	25
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29





## 1. ÁGUA PARA ANÁLISES QUÍMICAS INSTRUMENTAIS

### 1.1. Introdução

---

A água, tal como se encontra na Natureza, contém diversas outras substâncias que não a molécula  $H_2O$ : sais, compostos orgânicos, microorganismos, partículas, gases dissolvidos. Isso se deve basicamente a sua tão conhecida característica de solvente universal.

No laboratório, as várias utilizações dadas à água requerem maior ou menor grau de pureza. Esse grau de pureza é definido em função da aplicação, do método de análise, seus interferentes e sua sensibilidade e limite de detecção. Assim é que a água purificada e a sua qualidade são fatores críticos para a preparação de soluções em geral, tampões, fases móveis em cromatografia, brancos e também outros usos mais comuns, como lavagem de vidraria (enxágüe final), os quais nem por isso são menos importantes.

Definir, conhecer, remover e controlar os contaminantes da água são passos essenciais para a obtenção de água purificada no laboratório, de forma eficaz e econômica, atendendo em especial as necessidades que a aplicação específica exige.

A seguir, apresentamos em quatro tópicos as informações e conceitos que ajudarão a alcançar esses objetivos e decidir qual o tipo de água a ser utilizado em uma análise instrumental específica:

- Os contaminantes da água
- Monitoramento e controle da qualidade da água purificada
- Especificações de qualidade
- Tecnologias que podem ser empregadas para purificação de água em laboratórios

### 1.2. Os contaminantes da água

---

Como já foi dito, os contaminantes têm relação direta com a análise que se está realizando e a sensibilidade e limite de detecção do método empregado. Por exemplo, em HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – as análises que utilizam o detector ultravioleta são sensíveis aos compostos orgânicos que estejam presentes na água (componente da fase móvel) e que absorvem no comprimento de onda utilizado. Isso compromete os resultados e a própria curva de calibração. Além disso, os compostos orgânicos que não são detectados nesse comprimento de onda podem ser retidos e se acumular na coluna de HPLC, comprometendo sua eficiência e funcionalidade e provocando os chamados “picos fantasmas” num cromatograma.

Para fins didáticos, dividimos os contaminantes da água em cinco classes:

### 1.2.1. Compostos inorgânicos dissolvidos

São basicamente os sais dissolvidos na água, os íons inorgânicos presentes. Podem estar sob a forma de cátions ou ânions.

#### *Ânions:*

Íon cloreto (Cl<sup>-</sup>), Íon hipoclorito (HClO<sup>-</sup>), Nitratos, nitritos, carbonatos, Sulfatos, Silicatos, etc...

#### *Cátions:*

Sódio (Na<sup>+</sup>), Cálcio e Magnésio (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ferro (Fe<sup>++</sup>), Alumínio (Al<sup>+++</sup>), Metais pesados (Pb, Ni, Cr, Hg), etc...

### 1.2.2. Compostos orgânicos dissolvidos

Esta classe de contaminantes pode ter sua origem na Natureza ou em decorrência da poluição ou do próprio processo de potabilização da água para consumo humano.

#### ***Origem natural***

Aqui se encontram os materiais orgânicos provenientes da decomposição de vegetais e animais. A decomposição de vegetais ocorre muito comumente nos mananciais abertos (represas, reservatórios) onde a água é captada para posterior tratamento. Podemos citar, entre outros exemplos, taninos, ligninas, fenóis, ácidos húmicos (mistura complexa de macromoléculas com estrutura de polímero fenólico). Aqui, também, estão incluídos as proteínas, enzimas (nucleases, por exemplo), aminoácidos e seus derivados.

#### ***Origem não natural***

Trata-se dos compostos orgânicos que têm sua origem nas atividades humanas. Podemos destacar todos os tipos de pesticidas solúveis em água (fungicidas, inseticidas, herbicidas), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), bifenis policlorados (PCBs), EDTA (agente quelante que está presente em formulações de sabões, detergentes e cosméticos), citratos (em regiões próximas a culturas agrícolas cítricas).

### 1.2.3. Partículas e colóides

As partículas podem ser rígidas (areia, pedras, terra) ou deformáveis (restos vegetais). Sua característica como contaminante é o fato de ser escudo protetor para microorganismos contra a ação dos raios UV e agentes de desinfecção. São também um veículo para esses microorganismos já que as bactérias, por exemplo, podem aderir às partículas.

Nas análises instrumentais, as partículas também podem causar sérios problemas diretamente. Em HPLC, por exemplo, existe sempre o risco de entupimento da coluna e de dano ao pistão da bomba de injeção. Como se isso não bastasse, as partículas imobilizadas na entrada da coluna podem se transformar em outra fase estacionária, prejudicando de forma imprevisível as características de retenção da coluna e a separação propriamente dita.

Colóides são suspensões estáveis de partículas orgânicas ou inorgânicas, com tamanho que varia entre 0,1 a 0,001mm, apresentando a característica de todas as partículas possuírem a mesma carga e mesmo sinal. A repulsão que decorre disso mantém a suspensão estável. São de difícil remoção por filtração microporosa, mas podem ser retidos com facilidade por osmose reversa ou ultrafiltração.

#### 1.2.4. Microorganismos

Os microorganismos – bactérias, fungos (mofos e leveduras) e vírus - estão comumente presentes na água potável distribuída em uma cidade. Ainda que as empresas de tratamento processem a água para remover microorganismos nocivos à saúde humana, a água fornecida não é, de forma alguma, estéril. Os demais microorganismos remanescentes da potabilização podem causar problemas em análises.

#### 1.2.5. Gases dissolvidos

Podemos encontrar todos os gases existentes na atmosfera, dissolvidos na água.

O gás mais importante dissolvido na água é o gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Encontra-se em equilíbrio com o ácido carbônico e este com o íon bicarbonato:



Este equilíbrio origina um íon importante, o bicarbonato, que pode interferir com análises e prejudicar processos de purificação.

A taxa de dissolução de CO<sub>2</sub> e sua concentração na água depende da temperatura (quanto menor, maior a taxa de dissolução e absorção) e da pressão parcial de CO<sub>2</sub> no ambiente em que água está exposta.

Outros efeitos dos demais gases presentes no ar:

- Oxigênio: causa corrosão em tanques, tubulações, etc.
- Amônia: contaminante originado da adubação agrícola .
- SO<sub>2</sub> – contido em gases de escape de automóveis e emanações de indústrias.

### 1.3. Monitoramento e controle da qualidade da água purificada

---

Como já dissemos, os contaminantes presentes na água poderão causar interferências importantes nas determinações analíticas. Por isso mesmo, é importante quantificá-los e assegurar que atendam às especificações de qualidade. Além disso, essa quantificação é uma medida da eficiência do processo de purificação de água.

Neste tópico será considerada basicamente a detecção de contaminantes inorgânicos (íons) e orgânicos.

Há uma variedade imensa de contaminantes inorgânicos e analisá-los individualmente seria muito difícil e trabalhoso. É possível fazer uma determinação da contaminação iônica total de uma solução aquosa utilizando um parâmetro apenas: a condutividade, que é a condutância específica ou sua recíproca, a resistividade (resistência específica).

Igualmente, existem inúmeros contaminantes orgânicos que podem ocorrer na água purificada. Aqui, também, um único parâmetro pode ser utilizado para quantificá-los: COT – Carbono Orgânico/Oxidável Total (ou TOC – Total Oxydizable Carbon).

Quantificam-se bactérias e outros microorganismos utilizando-se métodos que empregam a filtração em membranas microporosas e posterior incubação com meios de cultura ou, mais recentemente, quimioluminescência. Os resultados são expressos em ufc/mL (unidades formadoras de colônias por mL).

A quantidade de partículas é controlável através de tecnologias de remoção específicas (microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa). Nos processos de purificação de água, isso é suficiente e em geral não há preocupação em quantificar as partículas presentes através das tecnologias adequadas para isso e que garantam que todas as partículas acima de um determinado tamanho sejam removidas.

### 1.3.1. Monitoração de contaminantes iônicos inorgânicos – condutividade e resistividade

A condução de corrente elétrica depende dos íons presentes na água. Quanto mais pura estiver a água, menor a concentração desses íons e, portanto, menor a condutividade. Para uma condutividade baixa, teremos sua recíproca, a resistividade, alta, uma vez que são expressões diferentes do mesmo fenômeno.

$$\text{Portanto: } C = 1/R \text{ ou } R = 1/C$$

Unidades de medida:

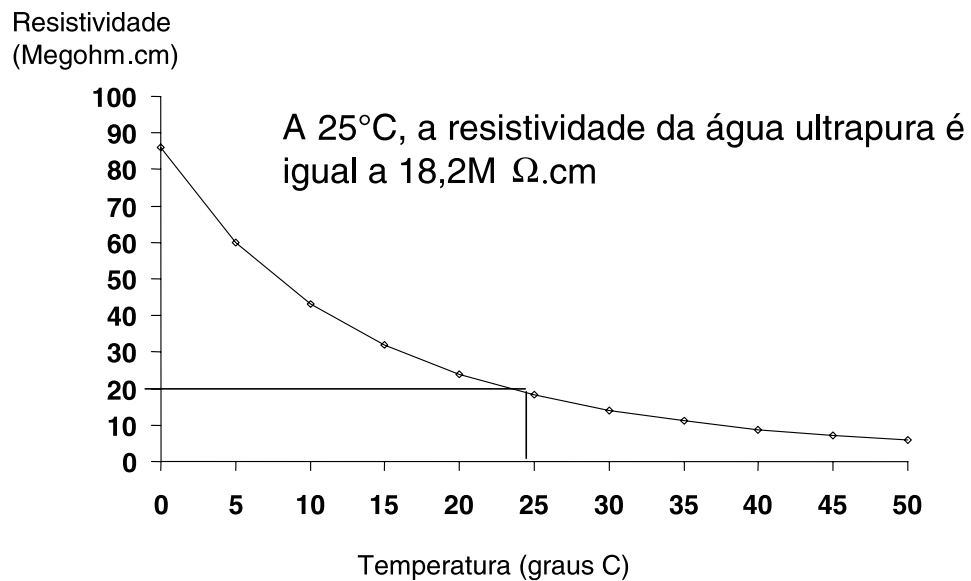
Condutividade – micromho/cm ou microSiemens/cm

Resistividade – Megohm.cm

A condutividade da água no limite teórico de purificação, isto é, quando praticamente todos os íons foram removidos restando apenas  $H^+$  e  $OH^-$ , é de 0,055 microSiemens/cm ou 18,2 Megohm.cm, a 25° C. Esta é a chamada água ultrapura do tipo I (ASTM).

O gráfico 1 mostra que a temperatura é um fator importante na medição da condutividade. Quanto menor a temperatura, maior a resistividade (portanto, menor a condutividade). Isso ocorre por que a baixas temperaturas, ocorre uma menor mobilidade dos íons na solução e essa mobilidade é inversamente proporcional a resistividade ou diretamente proporcional à condutividade.

**Gráfico 1. Variação da Resistividade e Condutividade em função da temperatura**

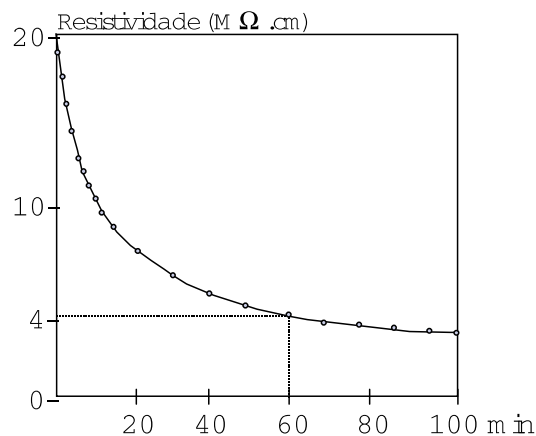


Daí a necessidade de se saber qual a temperatura da água ao se comparar essas medições. Condutímetro e resistímetro instalados nos equipamentos de purificação de água, em geral possuem um circuito de compensação de temperatura para 25° C, o que permite uma leitura direta.

À medida que a água fica mais pura, ou seja, sua condutividade diminui ou sua resistividade aumenta, maior a tendência e a velocidade com que a água irá agregar contaminantes do meio ambiente, voltando ao seu estado natural. Por isso, é imprescindível que a água ultrapura não seja armazenada e seja obtida no momento da sua utilização.

O gráfico 2 mostra essa avidez da água altamente purificada para retomar contaminantes, ilustrada pela queda acentuada da resistividade após apenas alguns minutos da purificação. Essa queda de resistividade ocorre pela contaminação com gás carbônico atmosférico que na água entra em equilíbrio com o íon bicarbonato, cuja presença promove o aumento da condutividade (ou diminuição da resistividade).

**Gráfico 2. Contaminação da água ultrapura por gases atmosféricos - CO<sub>2</sub> (20° C)**



### 1.3.2. Monitoração de contaminantes orgânicos – TOC ou COT – carbono oxidável total

Existem atualmente dois tipos de analisadores de COT. Os analisadores que utilizam a oxidação físico-química e os que utilizam a tecnologia patenteada pela Anatel Corporation.

A determinação de COT por métodos físico-químicos envolve primeiramente a remoção de  $\text{CO}_2$  da água a ser testada através de purga com nitrogênio. Isto traz um problema: é difícil remover todo o  $\text{CO}_2$ .

O segundo passo envolve a adição de reagentes (peróxidos) e a ação de um catalisador (UV ou calor) para iniciar a reação de oxidação. Uma vez completada esta oxidação, o gás carbônico por ela produzido é removido da amostra de água por borbulhamento com nitrogênio e recolhido por adsorção em uma coluna. A seguir é realizada uma desorção da coluna, através de aumento de temperatura e carreamento com um fluxo de nitrogênio puro. A presença de  $\text{CO}_2$  é detectada por espectrometria infravermelha e a concentração determinada pela integração do pico.

Este método apresenta diversas limitações na medição de COT em água ultrapura:

- Primeiro, existe o risco de contaminação durante a amostragem e o método não pode ser facilmente adaptado para medições em linha.
- É difícil, como foi mencionado, remover os últimos traços de  $\text{CO}_2$  no estágio de purga.
- Compostos orgânicos voláteis também são carreados pelo nitrogênio e, portanto, não são computados no COT total.
- Os reagentes de oxidação utilizados são mantidos em uma sala normal e, portanto, sujeitos a contaminação com  $\text{CO}_2$ .
- A tubulação do instrumento e a coluna sofrem uma lenta e cumulativa contaminação por materiais orgânicos que são adsorvidos e liberados de forma incontrollável.
- Por fim, a técnica requer o uso de muito nitrogênio de alta pureza, o que é extremamente dispendioso.

A segunda técnica, desenvolvida pela Anatel Corporation, é mais simples e envolve a oxidação de compostos orgânicos pela radiação UV. A radiação UV de comprimento de onda 185 nm converte  $\text{O}_2$  em ozônio ( $\text{O}_3$ ) que é um agente oxidante forte. Ozônio, por sua vez, reagirá com a água para formar, com a participação da radiação UV de 254 nm, radicais livres hidroxila que, então, reagirão com os compostos orgânicos, oxidando-os até gás carbônico. A queda de resistividade (ou aumento de condutividade) resultante é, então, medida e correlacionada para leitura de COT.

As principais vantagens deste método é que ele permite medições em linha de forma rápida e automática, sendo bastante sensível ( $< 1$  ppb COT), reprodutível, não utiliza reagentes e determinam todos os tipos de compostos orgânicos, inclusive os voláteis.

Entretanto, este método é adequado apenas para águas com resistividade maior que 3 Megohm.cm.

A concentração de COT é expressa em ppb – partes por bilhão.

## 1.4. Especificações de qualidade

Diversos órgãos normalizadores possuem suas especificações de qualidade, voltados às atividades específicas a que se dedicam. Temos as especificações da ASTM – American Society for Testing and Materials, direcionadas para a instrumentação analítica e para a indústria eletrônica. Temos também as especificações da United States Pharmacopeia (USP) voltadas à produção de medicamentos e as da ISO – International Organization for Standardization. Existem ainda a NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards que em conjunto com o CAP – College of American Pathologists especifica os tipos de água utilizados em laboratórios clínicos.

A norma da ASTM, designação D-1193-99, é a mais adequada para especificar os tipos de água utilizados em laboratórios químicos e, especialmente, análise instrumental.

A ASTM historicamente foi o primeiro órgão a propor normas para água de uso laboratorial, dividindo a água em quatro graus, de acordo com as aplicações:

**Tipo I** - também chamada água ultrapura, ou água grau reagente, utilizada para aplicações críticas de laboratório, incluídas aí as análises instrumentais por HPLC.

**Tipo II** - para aplicações pouco exigentes, tais como enxágüe de vidraria, análise qualitativa, ou ainda síntese orgânica.

**Tipo III** - para aplicações gerais em laboratório: preparação de meios de cultura e enxágüe final de vidraria em aplicações não críticas.

**Tipo IV** - abastecimento de sistemas produtores de água grau reagente.

Condutividade máxima μS/cm a 298K (25° C)	0,056	1,0	0,25	5,0
Resistividade mínima Megohm.cm, a 298K (25° C)	18	1,0	4,0	0,2
PH a 298K (25° C)	-	-	-	5,0 a 8,0
COT (Carbono Oxidável Total) Máximo, μg/L	100	50	200	sem limite
Sódio, máximo, μg/L	1	5	10	50
Cloretos, máximo, μg/L	1	5	10	50
Sílica Total, máximo, μg/L	3	3	500	sem limite

Contaminação Microbiológica – quando o nível das bactérias necessita ser controlado, o tipo de grau deverá ser promovido como se segue:

	Tipo A	TipoB	TipoC
Contagem máxima de bactérias heterotróficas	10/1000mL	10/100mL	100/10mL
Endotoxinas Eu/mL	<0,03	0,25	não se aplica

## 1.5. Tecnologias de purificação de água para laboratórios

Para purificar a água até os níveis especificados na ASTM e os demais órgãos, diversas tecnologias estão disponíveis:

- Destilação
- Deionização
- Osmose Reversa
- Eletrodeionização Contínua (EDI)
- Ultrafiltração
- Microfiltração em membrana
- Carvão Ativado
- Radiação Ultravioleta

### 1.5.1. Destilação

A destilação é um processo clássico de purificação de água, que utiliza a mudança de fase da água de líquida para vapor, com condensação para fase líquida. Nesse processo, muitos contaminantes são removidos, mas ainda assim não é possível obter água ultrapura tipo I utilizando-se a destilação.

Substâncias orgânicas de baixo ponto de ebulição também passam para a água destilada. Formam-se também misturas azeotrópicas e até compostos de alto peso molecular são arrastados com o vapor. Além disso, quando o cloro reage com compostos orgânicos naturais a altas temperaturas, formam-se compostos organoclorados que são igualmente carregados pelo vapor.

A sílica é extraída de destiladores em vidro, assim como ocorre com outros íons em destiladores metálicos.

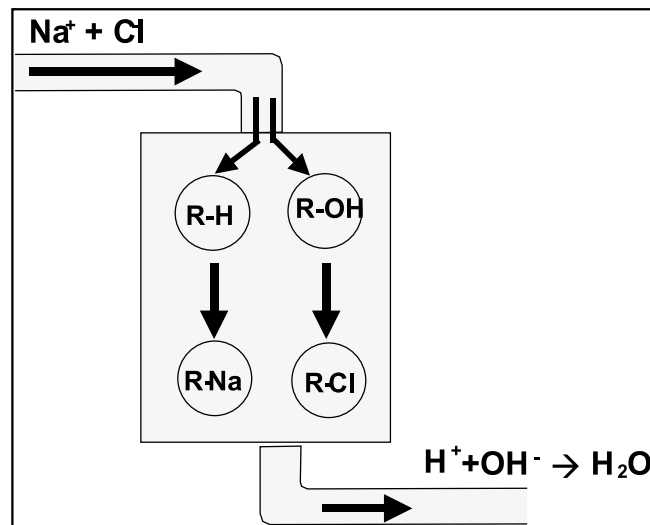
Além disso, o processo de destilação consome grande quantidade de energia e tem um consumo igualmente alto de água para resfriamento.

## DESTILAÇÃO

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remove uma grande porcentagem de todos os tipos de contaminantes.</li> <li>• Produz água com resistividade entre 0,2 e 1 Megohm.cm.</li> <li>• Investimento médio.</li> <li>• Processo muito conhecido e percebido como fácil de operar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nem todos contaminantes são removidos e diversos deles são gerados durante o processo.</li> <li>• Não há controle da qualidade da água.</li> <li>• Altos custos de operação: energia e água.</li> <li>• Manutenção regular ou pré-tratamento são fundamentais para garantir o desempenho.</li> </ul>



### 1.5.2. Deionização



**Figura 1. Esquema do processo de deionização em leito misto**

O processo de deionização é realizado utilizando-se resinas globulares porosas de troca iônica com diâmetros entre 0,3 e 0,8 mm. Essas resinas são fabricadas com cadeias poliméricas contendo ligações cruzadas de estireno e divinilbenzeno nas quais estão ligados grupos químicos carregados.

Nas resinas aniônicas, ou seja, as resinas que capturam ânions, esses grupos são de amônio quaternário. Nas catiônicas – resinas que capturam cátions – utilizam-se grupos sulfônicos.

No início de um processo de deionização, quando a resina não foi ainda utilizada, os íons ligados aos grupos negativos das resinas catiônicas são os prótons  $\text{H}^+$  e os íons ligados às aniônicas são as hidroxilas  $\text{OH}^-$ .

Durante o processo, cátions presentes na água ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , etc.) irão se ligar à resina catiônica, e deslocar o próton  $\text{H}^+$ , enquanto que os ânions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) irão se ligar à resina aniônica e deslocar as hidroxilas.

A deionização é um processo muito eficiente para a remoção de íons e até de alguns compostos orgânicos ionizados. Entretanto, as resinas constituem um excelente suporte para crescimento bacteriano. Como a água de alimentação não é estéril, o resultado é que a contaminação bacteriológica da água após uma coluna de deionização pode ser 1000 vezes maior do que a da água de entrada.

## DEIONIZAÇÃO

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>Efetiva na remoção de íons (Resistividade : 1 - 10 Megohm.cm).</li> <li>Instalação simples.</li> <li>Baixo investimento.</li> <li>Regenerável.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Não remove partículas, material orgânico ou microorganismos. Resinas regeneradas podem gerar partículas, orgânicos ou promover o crescimento de bactérias.</li> <li>Troca iônica padrão : origem da resina é desconhecida.</li> <li>Altos custos de operação : regeneração/ transporte.</li> <li>Qualidade da água é variável; glóbulos danificados.</li> </ul>

A regeneração das resinas pode ser realizada no próprio laboratório ou em prestadores de serviço que realizam esse processo, trocando uma coluna esgotada por outra regenerada. Isto pode ser fonte de contaminação iônica residual originária de utilizações em que a água de entrada ou do próprio ambiente a que essas resinas estiveram expostas.

Resinas de um único uso, portanto, não regeneráveis, são as mais indicadas para evitar todos esses problemas.

### 1.5.3. Osmose reversa

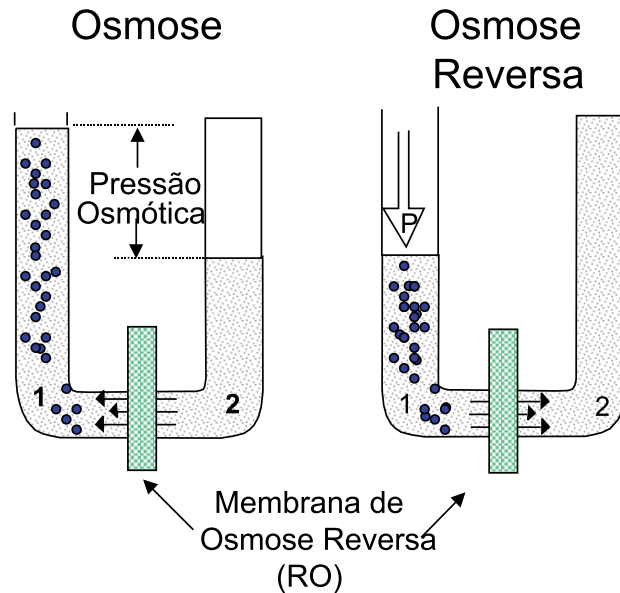


Figura 2. Esquema do princípio da osmose e da osmose reversa

Suponhamos que dispomos de um tubo em forma de “U”, com seus dois ramos separados por uma membrana de osmose. No ramo esquerdo, temos água com moléculas dissolvidas (representadas por pontos). De acordo com as leis termodinâmicas, as moléculas iriam se difundir do lado esquerdo para o direito, até que suas concentrações ficassem equivalentes. Porém, estas moléculas não conseguem atravessar a membrana, mas as moléculas de água sim. Dessa forma, a água atravessará

a membrana a partir do ramo direito em direção ao esquerdo para diluir as moléculas dissolvidas. Esse processo continuará até gerar um diferencial de pressão (pressão osmótica) entre os ramos, equilibrando assim a diferença de concentrações.

A osmose reversa é exatamente o oposto desse processo: a água contendo íons ou outros contaminantes é pressurizada contra uma membrana de osmose reversa e obtém-se água pura no outro lado da membrana. A pressão exercida deve ser superior à pressão osmótica.

Membranas de osmose reversa rejeitam tipicamente 90% dos íons monovalentes, 95% dos bivalentes e 99% dos polivalentes. São rejeitados também 99% dos compostos orgânicos com peso molecular superior a 300, vírus e bactérias.

A fim de obter um fluxo contínuo de moléculas de água nessa membrana, torna-se necessário remover os contaminantes de forma regular. Isto pode ser realizado através do chamado fluxo tangencial (figura 3), que permite que parte do fluxo de água percorra a superfície da membrana, promovendo assim uma verdadeira varredura e impedindo o acúmulo de contaminantes.

Nos equipamentos, essa configuração apresenta-se na forma de membranas enroladas em espiral, constituindo um cartucho em que os canais de permeado e rejeitado estão perfeitamente separados e estanques. Isso permite que se obtenha uma área grande de separação em um volume relativamente pequeno, permitindo assim a construção de sistemas compactos.

Sistemas de osmose reversa removem uma porcentagem razoável de todos os tipos de contaminantes, porém, essa remoção, justamente por ser percentual, não é suficiente para se obter os níveis de pureza requeridos para água, sequer do tipo II, na maior parte dos casos. No quadro a seguir são mostradas as vantagens e desvantagens desse processo.

### OSMOSE REVERSA

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remove uma porcentagem razoável de todos os tipos de contaminantes da água (íons, orgânicos, pirógenos, vírus, bactérias, partículas e colóides).</li> <li>• Baixos custos de operação devido a pouca utilização de energia elétrica.</li> <li>• Manutenção mínima.</li> <li>• Bom controle de parâmetros de operação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contaminantes não são suficientemente removidos para satisfazer as exigências da água tipo II.</li> <li>• Membranas de Osmose Reversa estão sujeitas a incrustações e obstruções em longo prazo (se não forem apropriadamente protegidas).</li> <li>• Consumo de água semelhante ao dos destiladores, até recentemente.</li> </ul>

**Figura 3. Esquema do fluxo tangencial em um sistema de osmose reversa**

O único uso de energia elétrica, neste processo, é destinado apenas a movimentar a bomba de pressurização, portanto, um consumo bastante baixo se comparado ao da destilação.

As membranas de osmose também podem sofrer incrustações e obstrução devido à precipitação de sais, principalmente carbonato de cálcio, reduzindo a vazão e danificando a estrutura da membrana. Por isso, faz-se necessário um controle dos íons incrustantes para evitar esse tipo de problema.

### 1.5.4. Eletrodeionização contínua

Se mergulharmos dois eletrodos - ânodo e cátodo - numa solução de NaCl, por exemplo, e aplicarmos uma diferença de potencial entre os dois eletrodos, os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  irão migrar em direção ao cátodo e ao ânodo respectivamente.

Existem membranas - denominadas membranas de troca iônica - permeáveis seletivamente a cátions ou a ânions, que permitem controlar essa migração. Estas membranas são fabricadas com fragmentos de resinas de troca iônica incluídos em uma matriz de polietileno. Esses fragmentos de resinas catiônicas ou aniônicas permitem assim a passagem de cátions ou ânions respectivamente.

Se introduzirmos essas membranas no sistema de NaCl e eletrodos que descrevemos, teremos o controle da migração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , como mostra a figura a seguir.

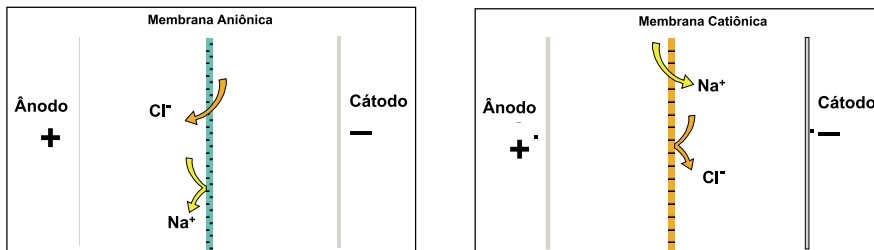


Figura 4. Controle da migração de íons por membranas de troca iônica

Na membrana aniônica, somente os íons cloreto de nosso modelo conseguem atravessar. Ao contrário, na catiônica, somente os íons sódio. Se montarmos um sistema em que alternamos as duas membranas e mantemos os eletrodos, temos o chamado sistema de eletrodialise (figura 5a).

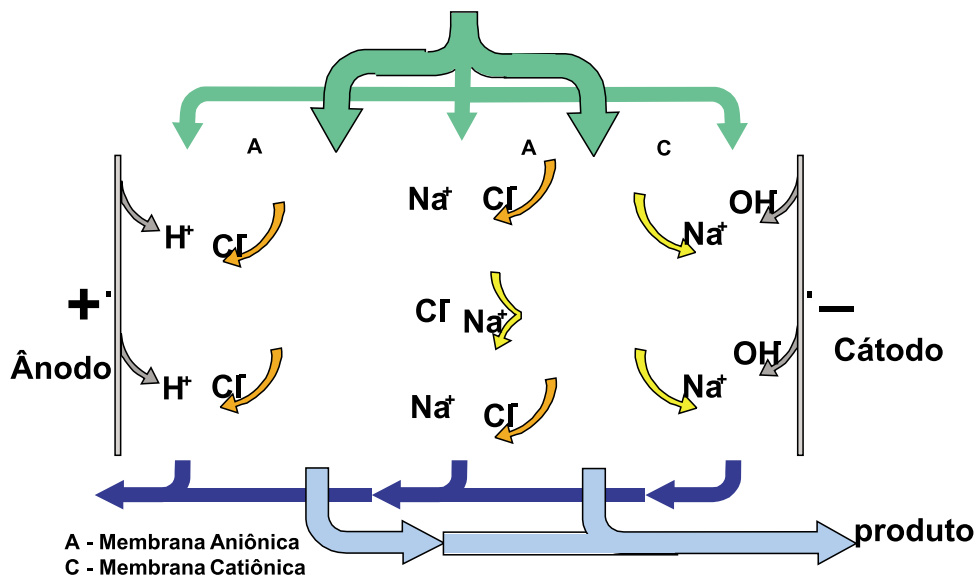


Figura 5. Sistema de eletrodialise

Na célula seguinte, prosseguindo à direita, vemos que os íons cloreto conseguem sair, assim como os íons sódio. Aqui observamos claramente uma depleção de íons e a eletroneutralidade também é mantida, pois para cada íon cloreto, temos um sódio deixando a mesma célula.

Na próxima célula, ao contrário, os íons estão se acumulando, uma vez que nem sódio nem cloreto conseguem deixá-la.

Como resultado, temos aqui um sistema em que os íons são concentrados em algumas células (fluxo de descarte) e estão praticamente ausentes em outras (fluxo de produto). Este processo pode ser utilizado para purificar água, mas é extremamente lento uma vez que os íons teriam que se mover de uma célula a uma membrana e em direção ao eletrodo.

Para melhorar o desempenho do sistema, as células de produto são preenchidas com resinas de troca iônica de leito misto (aniônicas + catiônicas). Isto permite que haja uma transferência iônica do centro da célula em direção à membrana semipermeável em vez de tráfegar a baixa velocidade na água, onde os choques devidos aos movimentos brownianos diminuiriam sua progressão. Assim, os íons pulam de sítio ativo em sítio ativo da resina em direção ao eletrodo de sinal oposto. Esta configuração permite também a captura de substâncias orgânicas de carga fraca.

As resinas são continuamente regeneradas, pois no campo elétrico formado há a geração de  $H^+$  e  $OH^-$ , formando microambientes em torno das resinas.

Porém, o processo de purificação por eletrodeionização contínua necessita ser alimentado com uma água já previamente purificada por osmose reversa, de forma que a concentração de sais já esteja atenuada.

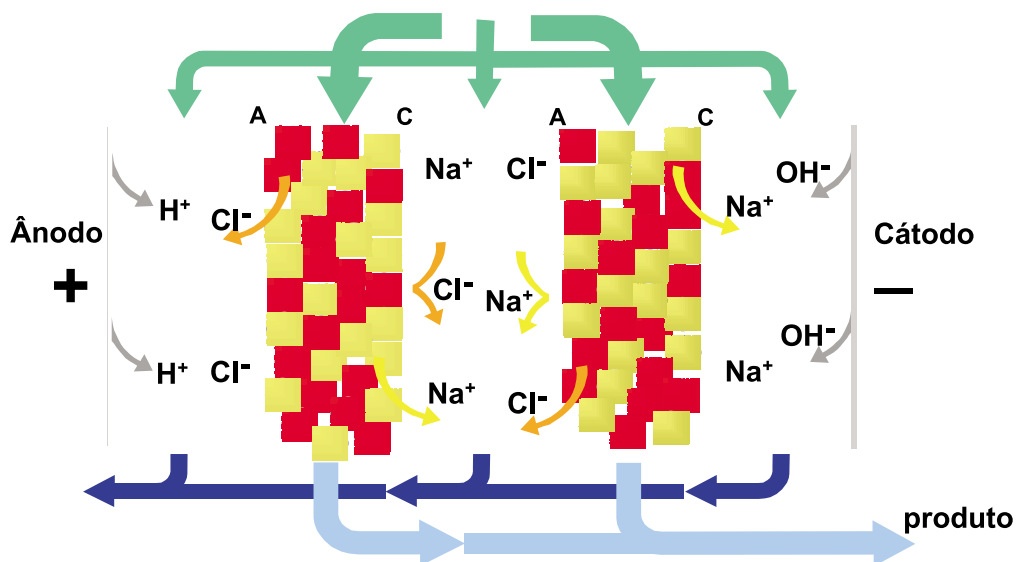


Figura 6. Resinas de troca iônica preenchendo as células de produto

## ELETRODEIONIZAÇÃO CONTÍNUA (EDI)

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>Remove eficientemente material inorgânico dissolvido.</li> <li>Requer manutenção mínima.</li> <li>Não requer regeneração das resinas.</li> <li>Baixo custo de operação.</li> <li>Excelente pré-tratamento para sistemas de ultrapurificação de água.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Necessita de pré-purificação.</li> </ul>

### 1.5.5. Ultrafiltração

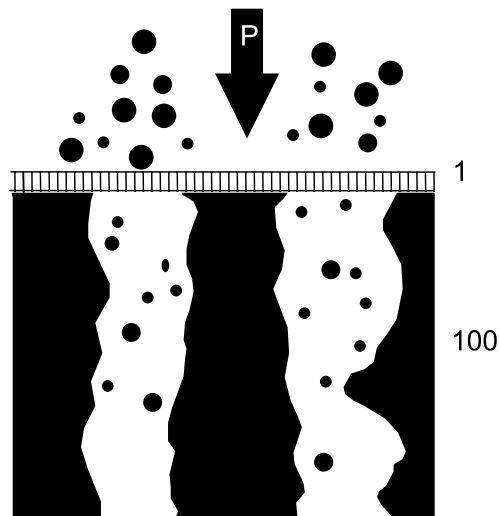
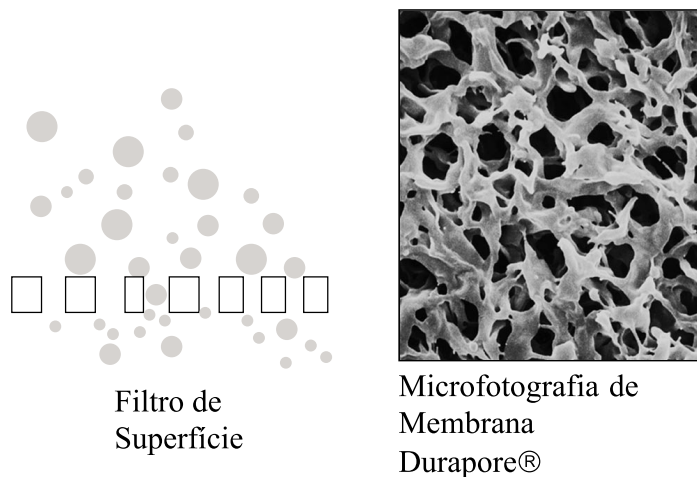


Figura 7. Representação do corte esquemático de um ultrafiltro, mostrando a proporção entre a camada ativa de separação (1) e a camada de suporte (100).



Ultrafiltros são membranas poliméricas, assimétricas, com uma camada ativa muito fina (1 micrometro de espessura) na parte superior e uma camada de suporte mais espessa (100 micrometros).

As membranas de ultrafiltração (UF) operam sob pressão. Nestas condições, moléculas pequenas conseguirão atravessar a camada ativa, enquanto as maiores serão retidas. O limite desse corte é denominado Limite Nominal de Peso Molecular (Nominal Molecular Weight Limit – NMWL) e é

expresso em daltons. Este valor é usado para caracterizar as membranas UF porque o peso molecular é mais fácil de encontrar na literatura do que as dimensões das moléculas.

O peso molecular relaciona-se diretamente ao tamanho da molécula, mas outros fatores também precisam ser considerados: forma, estereoquímica e pH da dispersão em que se encontram. Isto é fundamental no caso de proteínas.

A tabela a seguir mostra as vantagens e desvantagens da UF.

### ULTRAFILTRAÇÃO - UF

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção efetiva (&gt;99%) de todas moléculas orgânicas com peso molecular acima do NMWL. Muito eficiente na remoção de pirógenos e vírus, bem como partículas.</li> <li>• Não há risco de incrustação.</li> <li>• Baixo uso de água e energia.</li> <li>• Baixa manutenção; procedimentos bem documentados / aceitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quase nenhuma remoção de íons, gases e orgânicos de baixo peso molecular (as membranas de UF mais fechadas tem um cut-off de 1,000 dalton).</li> </ul>

**Figura 8. Representação de corte transversal de filtro de superfície e microfotografia de membrana Durapore® (Foto: cortesia de Millipore Ind. e Com. Ltda)**

Como pode ser visto, estas membranas são muito eficientes na remoção de compostos orgânicos de alto peso molecular.

#### 1.5.6. Microfiltração em membrana

Existem três principais tipos de filtros: filtros de profundidade, de superfície e de membrana.

Filtros de profundidade são fabricados com fibras aglomeradas e retêm contaminantes em toda a sua espessura. Possuem uma alta capacidade, mas não apresentam um limite de retenção muito claro. Sua eficiência está por volta de 95% e varia com a vazão. Além disso, podem liberar contaminantes no filtrado, geralmente fibras ou material que foi retido.

Filtros de superfície são geralmente fabricados com múltiplas camadas de material não fibroso, capturando os contaminantes principalmente na sua superfície e possuindo uma capacidade intermediária de retenção e eficiência (98%).

Filtros de tela ou de membrana retêm contaminantes na sua superfície através de um efeito de peneiramento. Possuem baixa capacidade, mas promovem 100% de retenção de contaminantes cujo tamanho é maior do que seu limite de corte bem definido. Filtros de tela típicos são os de membrana, onde a sua integridade pode ser verificada através de testes específicos como, por exemplo, ponto de bolha ou difusão.

## MICROFILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção de 100 % de todos contaminantes (partículas, bactérias) maiores que o tamanho do poro. Teste de integridade disponível.</li> <li>• Filtração esterilizante (membranas 0,22 µm).</li> <li>• Manutenção mínima: simplesmente substitua quando necessário.</li> <li>• Altas vazões são obtidas a baixas pressões.</li> <li>• Eficiência independente da vazão.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efeito mínimo sobre outros contaminantes.</li> <li>• Retenção na superfície: pode estar sujeita à obstrução ou entupimento.</li> </ul>

A principal vantagem dos filtros de membrana é a remoção de 100% de todos os contaminantes com tamanho superior ao do seu diâmetro de poro. As membranas com poro de 0,22 µm de diâmetro são usadas na indústria farmacêutica há muitos anos para filtração esterilizante de soluções.

### 1.5.7. Carvão ativado

O carvão ativado é usado principalmente pela sua capacidade de adsorção de materiais orgânicos devido a sua grande área superficial: até 1000 m<sup>2</sup> /g.

Outra função é a redução de oxidantes, como o cloro livre, presentes na água e que poderiam afetar membranas de osmose reversa ou resinas de troca iônica. Trata-se, portanto, de uma tecnologia voltada principalmente para o pré-tratamento e a proteção de outras etapas.

## CARVÃO ATIVADO

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção efetiva de uma ampla gama de substâncias orgânicas (mesmo de baixo peso molecular) por ligação não específica (forças de Van der Waals ).</li> <li>• Grande capacidade devido a grande área superficial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muito pouco efeito sobre outros contaminantes (exceto algumas partículas removidas por filtração em profundidade).</li> <li>• Quando todos os sítios estão ocupados, estabelece-se o equilíbrio e os orgânicos são liberados.</li> <li>• Bactérias podem se desenvolver após algum tempo.</li> <li>• Eficiência depende da vazão.</li> </ul>

### 1.5.8. Radiação ultravioleta (UV)

As radiações UV apresentam comprimentos de onda entre 100 e 400 nm, divididos em quatro campos: ondas ultracurtas, curtas (UV-C), médias (UV-B) e longas (UV-A). Podem ser produzidas facilmente por lâmpadas com baixa pressão de vapor de mercúrio que emitem radiações em dois comprimentos de onda: 185 e 254 nm.

As radiações com comprimento entre 200 e 300 nm destroem microorganismos pela quebra da cadeia de DNA. Isso se processa de forma mais intensa no comprimento de 260 nm. Portanto, o comprimento de 254 nm possui uma eficiência bem próxima (80%) do considerado ótimo para essa finalidade.

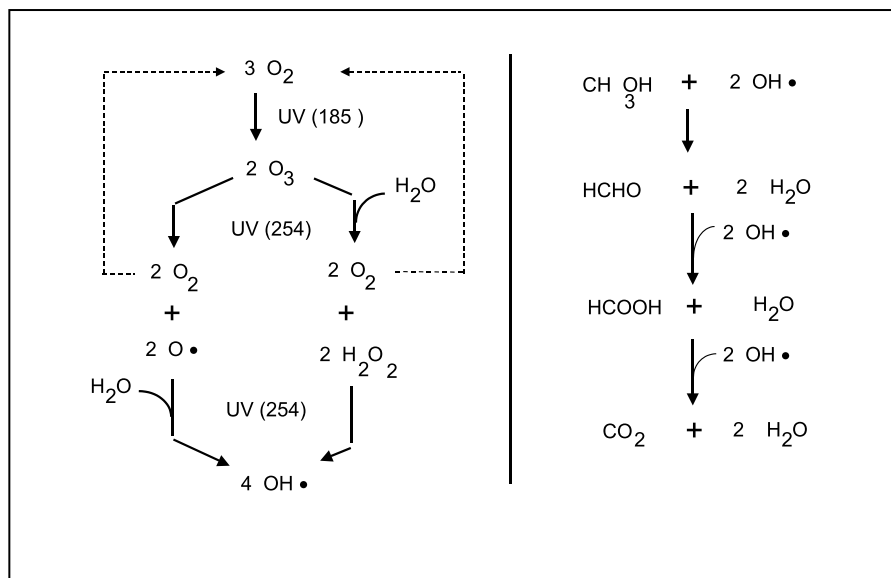


Porém, é necessário um projeto bastante criterioso para que essa eficiência seja realmente alcançada, levando em consideração principalmente à capacidade de penetração da radiação UV, da ordem de 1 cm. É preciso promover uma vazão suficiente para que essa penetração ocorra, respeitando o tempo de residência da água na câmara de exposição.

Uma outra aplicação muito importante da radiação UV é a redução dos níveis de COT – Carbono Oxidável Total (TOC) da água purificada.

Na verdade, a UV não destrói os compostos orgânicos diretamente, mas gera ozônio oxidará as substâncias presentes na água.

Como pode ser visto na figura abaixo, à esquerda, dois comprimentos de onda diferentes são necessários para gerar os radicais livres hidroxila (OH•) que posteriormente irão realizar a oxidação dos compostos orgânicos.



**Figura 9. À esquerda: seqüência de reações para a formação do radical livre hidroxila. À direita: reações de oxidação de compostos orgânicos. Exemplo: metanol.**

Ambos os mecanismos, descritos na literatura (Norrish et al., 1965 e Banford et al. 1967), requerem a ação de comprimentos de onda de 185 e 254 nm e a presença de oxigênio na água. A estequiometria de ambos os mecanismos é a mesma e leva à formação do mesmo número de radicais hidroxila.

No lado direito da figura, apresentamos um exemplo de oxidação de um composto orgânico sem carga: metanol. Trata-se de uma das mais simples moléculas orgânicas, com apenas um átomo de carbono. Esta molécula, sob a ação dos radicais livres hidroxila, é oxidada sucessivamente na escala crescente de oxidação: partindo de álcool, em seguida aldeído, ácido e por fim gás carbônico e água.

Como já vimos anteriormente, gás carbônico e água estão em equilíbrio com ácido carbônico que por sua vez está em equilíbrio com o íon bicarbonato e H<sup>+</sup>. A remoção do carbono, portanto, se dá nesta forma e é realizada por resinas de troca iônica.

Observe-se que pela conversão do carbono orgânico em um íon de fácil remoção por deionização, foi possível reduzir o nível de COT da água purificada.

### **RADIAÇÃO UV (185 + 254 nm)**

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conversão de traços de contaminantes orgânicos em espécies com carga e ao final em CO<sub>2</sub> (185 + 254).</li> <li>• Destruição limitada de microorganismos e vírus (254).</li> <li>• Baixo uso de energia.</li> <li>• Fácil operação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de polimento apenas: pode ser prejudicada se a concentração de orgânicos na água de alimentação for muito alta.</li> <li>• Orgânicos são convertidos e não removidos.</li> <li>• Efeito limitado sobre outros contaminantes.</li> <li>• Projeto tem de ser adequado para garantir eficácia.</li> </ul>

## 2. ESPECIFICAÇÕES PARA ÁGUA PURIFICADA

### 2.1. Objetivo

Esta especificação cobre requisitos apropriados para água para usos em métodos de análise química e testes físicos. Foi baseada nas especificações da **ASTM D1193-99**, com alterações. Quatro classes foram especificadas:

	Tipo I	TipoII	TipoIII	TipoIV
Condutividade máxima $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 298K (25° C)	0,056	1,0	0,25	5,0
Resistividade mínima Megohm.cm, a 25° C	18	1,0	4,0	0,2
PH a 25° C	-	-	-	5,0 a 8,0
COT (Carbono Oxidável Total) Máximo, $\mu\text{g}/\text{L}$	10	50	200	sem limite

A medida do pH da água grau reagente tipo I, II e III é eliminada das especificações pelo fato da água nesses graus de purificação não conter componentes em quantidades suficientes para significar a alteração do pH.

Os métodos de preparação dos vários tipos de água determinam os limites de impurezas e deverão seguir as seguintes especificações:

- 2.1.1. Grau tipo I** de água reagente deverá ser preparado por um processo de pré-purificação adequado, seguido por um polimento realizado com sistema de ultrapurificação composto por resina de troca iônica de leito misto e membrana final de  $0,22\mu\text{m}$ . A preparação deve ser realizada sempre no momento do uso. É recomendado, mas não obrigatório, que o sistema de ultrapurificação (polimento final) possua uma lâmpada UV com emissão de 185 e 254 nm de forma a reduzir ao máximo os níveis de COT. Além disso, também é recomendado, mas não obrigatório, que o equipamento de ultrapurificação (polimento final) possua um medidor de COT em linha, para monitoramento constante dos contaminantes orgânicos. O abastecimento (pretratamento) do passo final da água deverá apresentar no máximo  $10\mu\text{S}/\text{cm}$  de condutividade a  $25^\circ\text{C}$ .
- 2.1.2. Grau tipo II** de água reagente deverá ser preparada por processo de osmose reversa combinado por eletrodeionização, destilação ou troca iônica tendo uma condutividade menor que  $1,0\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Troca iônica, ou osmose reversa e adsorção orgânica podem ser necessários associados à destilação se a pureza não for atingida por um único passo de destilação.
- 2.1.3. Grau tipo III** de água reagente deverá ser preparado por osmose reversa seguida por eletrodeionização contínua, destilação, troca iônica, ou uma combinação destes, seguidos por um polidor com um filtro de membrana de  $0,45\mu\text{m}$ . O uso deste filtro torna-se necessário apenas em casos que a contaminação microbiológica é requerida.

**2.1.4. Grau tipo IV** de água reagente poderá ser preparado por osmose reversa, destilação, troca iônica, osmose reversa seguida de eletrodeionização contínua, eletrodialise, ou uma combinação destes.

A escolha de um dos vários tipos podem ser determinada pelo método ou por investigação.

Esta especificação não pretende abranger os aspectos referentes a segurança, associados com a aplicação. É de responsabilidade do usuário estabelecer o padrão apropriado de segurança e práticas saudáveis e determinar a aplicabilidade dos limites de regulamentação prioritários ao uso.

## 2.2. Monitoramento da qualidade dos diversos tipos de água

---

**2.2.1. Condutividade e resistividade:** Para a medição da condutividade ou resistividade deverá ser utilizado o condutivímetro ou resistivímetro do próprio equipamento de purificação de água, desde que devidamente calibrado. Nos casos em que se utiliza um destilador que não possui esse medidor acoplado, a medição deverá ser realizada com um condutivímetro portátil igualmente calibrado.

**2.2.2. COT – carbono oxidável (orgânico) total** – Ainda que se especifiquem os valores de COT para todos os tipos de água, apenas a água **Grau tipo I** é crítica nesse aspecto, pois é a água que entrará em contato com os equipamentos analíticos e níveis elevados de COT poderão causar resultados prejudicados. Este grau necessita, portanto, de acompanhamento sistemático dos níveis de TOC. A recomendação é que nos casos de equipamentos de ultrapurificação de água (polidores finais), estes já tenham acoplado um medidor de COT em linha, devidamente calibrado. Nos casos em que isto não ocorra, a medição deverá ser realizada em linha, por equipamento utilizando a técnica de fotooxidação para resistividades maiores que 3 megohm.cm.

### 2.2.3. Freqüência das medições:

#### 2.2.3.1. Resistividade e condutividade:

2.2.3.1.1. Diariamente para Água tipo I, II, III ou IV.

2.2.3.1.2. No momento da retirada da água, para Água tipo I.

#### 2.2.3.2. COT – carbono oxidável total:

2.2.3.2.1. Nos casos em que não há medidor incorporado ao equipamento, a medição de COT deverá ser realizada pelo menos uma vez a cada quinzena.

2.2.3.2.2. Nos casos em que o equipamento de ultrapurificação dispôr do medidor de TOC, a medição deverá ser realizada no momento da retirada da água.

## 2.3. Calibração e qualificação

---

**2.3.1.** Cada um dos sistemas de purificação de água deverá ter seus medidores calibrados e deverão ser qualificados nos aspectos Instalação, Operação e Desempenho.

## 2.4. Recomendações de armazenagem

---

- 2.4.1. **Água grau tipo I** – Não deve ser armazenada, pois sua degradação é muito rápida. Deverá ser preparada no momento do uso.
- 2.4.2. **Água grau tipo II, III e IV** – poderão ser armazenadas em reservatório protegido contra contaminações externas da atmosfera. Recomenda-se fortemente que o período de armazenamento dessa água purificada não exceda vinte e quatro horas a partir de sua preparação.

## 2.5. Manutenção dos equipamentos de purificação de água

---

Deverão ser seguidas todas as indicações do fabricante, principalmente com relação à troca de material de consumo e limpezas eventualmente necessárias. É recomendável estabelecer um programa de manutenção preventiva para cada equipamento e manter um registro das substituições de material de consumo e das manutenções realizadas.

## 2.6. Formulários de controle

---

Os anexos 1 e 2 trazem modelos de formulários de controle para registro das medições de resistividade ou condutividade e TOC.

## 2.7. Documentos de referência

---

- D1193 Standard Specifications for Reagent Water
- D1125 Test Methods for Electrical Conductivity and Resistivity of Water
- D1129 Terminology Relating to Water
- D1293 Test Methods for pH of Water
- D4453 Practice for Handling of Ultra-Pure Water Samples
- D4779 Test Method for Total, Organic, and Inorganic Carbon in High Purity Water by Ultraviolet (UV) or Persulfate Oxidation, or Both, and Infrared Detection
- D5391 Test Method for Electrical Conductivity and Resistivity of a Flowing High Purity Water Sample
- D5542 Test Method for Trace Anions in High Purity Water by Ion Chromatography
- D5997 Test Method for On-Line Monitoring of Total Carbon, Inorganic Carbon in Water by Ultraviolet, Persulfate Oxidation and Membrane Conductivity Detection

**Anexo 1. Modelo de formulário de controle para equipamentos de ultrapuração de água (polimento final) que dispõem de medidor de COT acoplado.**

DATA	Hora	Resistividade Megaohm.cm 25° C	COT – Carbono Orgânico Total ppb	Registrado por:	Notas:







### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Society for Testing and Materials D1193-99, “Standard Specification for Reagent Water” (1999).

Millipore, site na Internet: <http://millipore.com/H2O>.

Millipore Indústria e Comércio Ltda. – Seminários de Purificação de Água para Laboratórios.

Norrish et al., Proc.Roy.Soc.Ser. A. 288: 316 (1965).

Banford et al., Photochemistry and Reaction Kinetics. P.G. Ashmore et al., Ed. Cambridge (1967).



# Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume II

**Módulo 3:  
Instrumentação Analítica**

### Volume II – Módulo 3 – Instrumentação Analítica

#### Editores e Colaboradores:

- Aداuto da Silva – VARIAN
- Celso Ricardo Camargo - SINC BRASIL
- Demian Rocha Ifa – SINC BRASIL
- Ivan Jonaitis – AGILENT TECHNOLOGIES
- José Apareido Soares - VARIAN
- Luiz Rinaldo Bizaio - VARIAN
- Renato Guvêa - AGILENT TECHNOLOGIES
- Renato eres - FLOWSERVICE
- Ricardo Lira - FLOWSERVICE
- Robson Sanches Bizi - VARIAN

#### Coordenação:

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva - ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla - ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira - ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira - ANVISA
- Max Weber Marques Pereira - ANVISA
- Renato Almeida Lopes - ANVISA

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRA VIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)</b> .....	8
2.1. Introdução .....	8
2.2. Princípio da técnica .....	10
2.2.1. Espectro luminoso .....	10
2.2.2. Processos de absorção .....	10
2.2.3. Espectro de absorção UV - Vis .....	12
2.2.4. Efeito de solventes .....	14
2.3. Descrição básica do sistema .....	15
2.3.1. Fontes de radiação .....	15
2.3.2. Monocromador ( óptica ).....	16
2.3.2.1. Simples feixe .....	17
2.3.2.2. Arranjo de diodos .....	18
2.3.2.3. Duplo feixe.....	18
2.3.3. Compartimento de amostras .....	19
2.3.3.1. Acoplador de fibra óptica .....	19
2.3.3.2. Sipper .....	19
2.3.3.3. Suporte para amostras sólidas .....	19
2.3.3.4. Acessórios de reflectância .....	20
2.3.4. Aquisição de dados .....	20
2.4. Requisitos mínimos de instalação e operação .....	20
2.5. Cuidados básicos .....	21
<b>3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC)</b> .....	22
3.1. Introdução .....	22
3.2. Princípio da técnica .....	22
3.3. Descrição básica do sistema .....	23
3.3.1. Gases utilizados .....	24
3.3.2. Controladores de fluxo e pressão .....	25
3.3.3. Injetores .....	25
3.3.3.1. Injetores empacotados.....	25
3.3.3.2. Injetores capilares .....	26
3.3.4. Colunas .....	27
3.3.4.1. Forno de colunas .....	28
3.3.5. Detectores .....	28
3.3.5.1. Detector de ionização de chama (FID) .....	28
3.3.5.2. Detector de nitrogênio e fósforo (NPD) ou termo-iônico específico (TSD) .....	29
3.3.5.3. Detector de captura de elétrons – ECD .....	30
3.3.6. Aquisição e processamento de dados.....	31
3.4. Requisitos mínimos de instalação e operação .....	31

3.5. Cuidados básicos .....	32
<b>4. CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA(LC) .....</b>	<b>33</b>
4.1. Introdução .....	33
4.2. Princípio da técnica .....	33
4.2.1. Modos de separação: .....	34
4.2.1.1. Cromatografia em fase normal.....	34
4.2.1.2. Cromatografia em fase reversa .....	35
4.3. Descrição básica do sistema .....	36
4.3.1. Fase móvel .....	37
4.3.2. Sistema de bombeamento de solventes .....	38
4.3.3. Introdução de amostra - injetor .....	38
4.3.3.1. Injetor manual.....	38
4.3.3.2. Injetor automático .....	39
4.3.4. Colunas .....	39
4.3.4.1. Fases estacionárias à base de sílica .....	39
4.3.4.2. Fases quimicamente modificadas .....	40
4.3.5. Detectores .....	40
4.3.5.1. Detectores de UV-VIS .....	41
4.3.5.2. Detector de fluorescência .....	43
4.3.5.3. Detectores eletroquímicos .....	43
4.3.6. Aquisição e processamento de dados .....	44
4.3.6.1. Porcentagens de área .....	45
4.3.6.2. Normalização de área .....	45
4.3.6.3. Padrão externo .....	46
4.3.6.4. Padrão interno .....	46
4.4. Requisitos mínimos de instalação e operação .....	47
4.4.1. Requisitos da bancada .....	47
4.4.2. Rede elétrica .....	47
4.4.3. Condições ambientais .....	48
4.5. Cuidados básicos .....	48
<b>5. SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA ACOPLADOS A DETECTORES</b>	
<b>DE MASSA .....</b>	<b>50</b>
5.1. Introdução .....	50
5.2. Princípio da técnica .....	50
5.3. Descrição básica do sistema .....	51
5.3.1. Fonte de ionização .....	51
5.3.1.1. Impacto de elétrons (EI) .....	51
5.3.1.2. Ionização química (CI) .....	51
5.3.1.3. Electrospray (ES) .....	52
5.3.2. Analisadores de massas .....	54
5.3.2.1. Analisadores de massas quadrupolar .....	54
5.3.2.2. Analisadores de massas quadrupolar “ion trap” .....	55

5.3.2.3. Espectrometria de massas seqüencial (tandem mass spectrometry).....	57
5.3.3. Detectores .....	58
5.3.3.1. Multiplicadores de elétrons .....	58
5.3.3.2. Placas microcanais .....	59
5.3.3.3. Foto-multiplicador .....	60
5.3.4. Aquisição e processamento de dados .....	60
5.4. Requisitos mínimos de instalação e operação .....	61
5.4.1. Requisitos da bancada .....	61
5.4.2. Rede elétrica .....	61
5.4.3. Condições ambientais .....	62
5.5. Cuidados básicos .....	62
5.5.1. Sistema de vácuo .....	62
5.5.2. Fonte de íons .....	63
5.5.3. Sistema de nitrogênio .....	63
5.5.4. Treinamento em cuidados básicos .....	63
5.5.5. Arquivos de sintonia .....	63
<b>6. VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE INSTRUMENTOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>64</b>
6.1. Introdução .....	64
6.1.1. DQ – Qualificação de projeto .....	65
6.1.2. IQ – Qualificação de instalação .....	65
6.1.3. OQ - Qualificação de operação .....	65
6.1.4. PQ – Qualificação de desempenho .....	66
6.2. Espectrofotometria de ultra violeta - visível (UV-VIS) .....	66
6.2.1. Manutenção preventiva .....	66
6.2.2. Qualificação de operação (OQ) .....	67
6.2.3. Qualificação de desempenho (PQ) .....	67
6.2.3.1. Farmacopéia européia.....	67
6.2.3.2. Farmacopéia americana .....	68
6.3. Cromatografia em fase gasosa – GC .....	68
6.3.1. Manutenção preventiva de GC .....	68
6.3.2. Qualificação de operação .....	68
6.3.2.1. Controle de fluxos .....	68
6.3.2.2. Controle de temperaturas .....	69
6.3.2.3. Precisão de sinal do(s) detector(es) .....	69
6.3.2.4. Precisão do amostrador automático .....	70
6.3.2.5. Cálculos efetuados pelo sistema de dados .....	70
6.4. Cromatografia em fase líquida HPLC .....	70
6.4.1. Manutenção preventiva de HPLC .....	70
6.4.2. Qualificação de operação .....	71
6.4.2.1. Qualificação do detector .....	72
6.4.2.2. Qualificação da bomba .....	72
6.4.2.3. Qualificação do forno de colunas .....	73
6.4.2.4. Qualificação do amostrador automático .....	73

6.4.2.5. Sistema de dados .....	73
6.5. Sistemas de cromatografia acoplados a detectores de massas .....	73
6.5.1. Manutenção preventiva de sistemas detectores de massas .....	73
6.5.1.1. Sistemas de vácuo.....	73
6.5.1.2. Detector de massas .....	74
6.5.1.3. Cromatógrafo .....	74
6.5.2. Qualificação de operação .....	74
6.5.2.1. Precisão do injetor.....	75
6.5.2.2. Linearidade do injetor.....	75
6.5.2.3. Carry-over .....	75
6.5.2.4. Linearidade do detector.....	75
6.5.2.5. Exatidão de massas .....	75
6.5.2.6. Sensibilidade .....	75
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>



## 1. INTRODUÇÃO

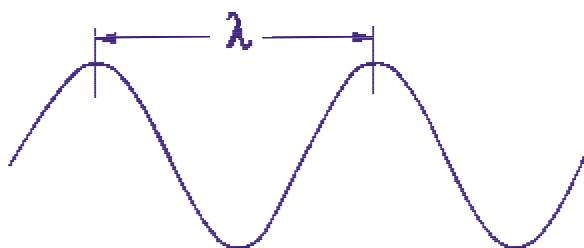
A utilização de técnicas de instrumentação analítica nos laboratórios é uma necessidade não apenas para caracterizar uma substância ou garantir a qualidade de um produto, mas também para um aumento de produtividade de análises; com isto, temos um crescente número de instrumentos com alto grau de automação, podendo ser operados remotamente. Contudo, temos que ter a consciência de que para uma boa utilização e desempenho destes instrumentos são necessárias algumas regras básicas como: saber o propósito de sua utilização, uma adequada instalação, evidências de seu desempenho, pessoal treinado em sua operação, seguir as orientações do fabricante com cuidados básicos a serem tomados pelo operador e rotinas de substituição de materiais consumíveis, pessoal que tenha sólidos conhecimentos na técnica numa eventual implementação de um método analítico, um programa de manutenções preventivas e de verificação de desempenho compatível com sua utilização em rotina, avaliação de parâmetros que assegurem uma contínua garantia da qualidade dos resultados obtidos, enfim, um planejamento detalhado sempre com evidências do que está sendo realizado. Estamos abordando neste capítulo as principais técnicas de instrumentação analítica utilizadas num laboratório de bioequivalência para que o profissional desta área possa iniciar seu estudo e ter este material como referência. Um outro propósito foi o de abordar a verificação de desempenho de cada instrumento e conceitos de validação aplicados a instrumentação analítica.

## 2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRA VIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)

### 2.1. Introdução

A espectrofotometria de Ultravioleta - Visível é uma técnica analítica baseada na propriedade que muitas espécies iônicas ou moleculares possuem de absorver radiações ultravioleta e visível em solução. As radiações nestas regiões envolvem fótons com energia suficiente para provocar transições dos elétrons de valência, em função de perturbações que passam a ocorrer.

A perturbação produzida pelos campos elétricos e magnéticos propaga-se pelo espaço, originando a expressão radiação eletromagnética. Deve-se ter em mente, que os campos elétricos e magnéticos são campos perpendiculares entre si e que os valores de propagação onde ocorrem os máximos e os mínimos dos campos são sempre coincidentes, ou seja, os campos estão em fase, como uma onda. Na figura 1, pode-se verificar que enquanto se propaga para a direita com velocidade  $V$ , um ponto qualquer fixo sobre o eixo  $X$  passa a ter sucessivamente picos e vales da onda. Define-se, então, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) como sendo a distância percorrida pela onda para que os dois máximos atinjam o ponto fixo de observação. O comprimento de onda é usualmente expresso em nanômetros (nm).



**Figura 1. Comprimento de onda**

As radiações Ultravioleta - Visível (UV-Vis) constituem uma parte relativamente pequena do espectro eletromagnético no qual estão incluídos outras formas de radiações como ondas de rádio, conforme figura 2. Os limites destas regiões são determinados pelos limites práticos de métodos experimentais de produção e detecção das radiações.

A diferenciação das regiões espectrais tem significado adicional para o químico, no sentido de que as interações físicas seguem diferentes mecanismos e fornecem diferentes tipos de informações. Quando uma radiação é incidida em uma substância semitransparente, a radiação é somente parcialmente transmitida. A radiação restante é refletida ou absorvida em diversos ângulos (figura 3), dependendo da substância e do comprimento de onda da radiação.

O tipo e a quantidade de radiação, que é absorvida, é a que possui maior importância analítica. Infelizmente, não há um método direto para determinar a radiação absorvida, entretanto, pode-se obter a informação indiretamente pela medida da radiação transmitida.

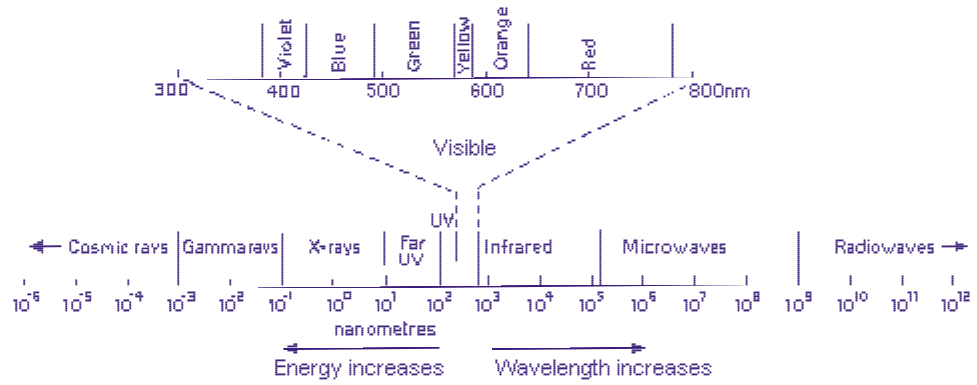


Figura 2. Espectro eletromagnético

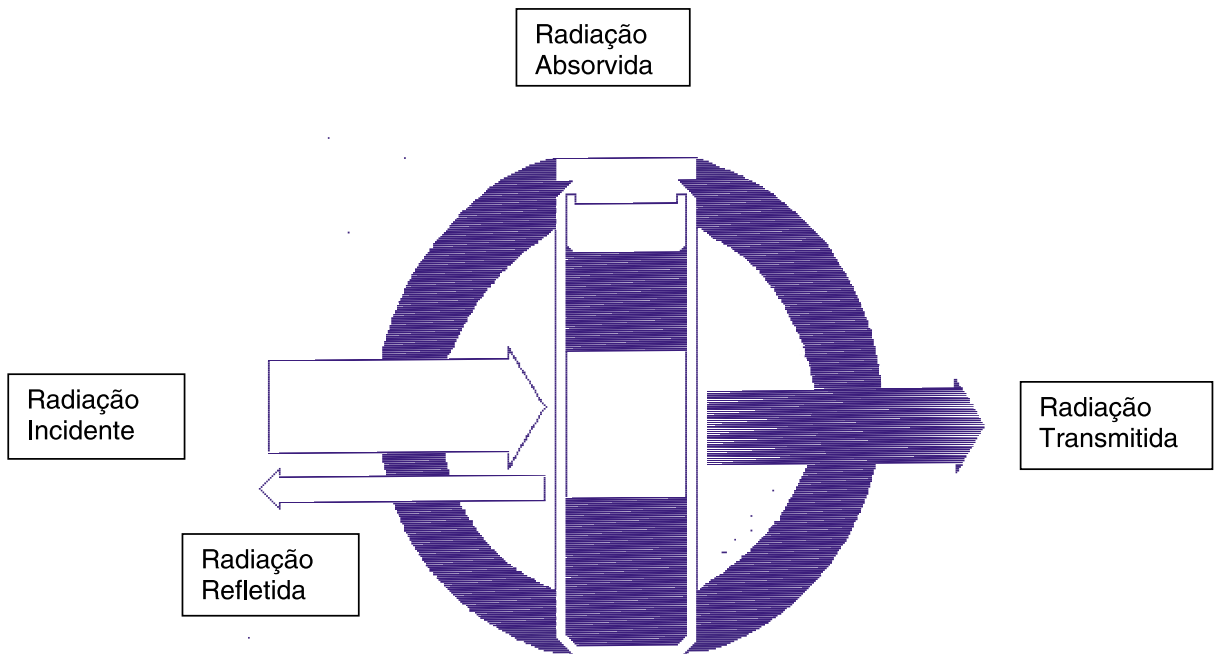


Figura 3. Radiação absorvida, transmitida e refletida

Se a intensidade de uma luz transmitida é representada graficamente em função do comprimento de onda, um espectro de absorção da substância é obtido. Esta é a absorção seletiva da radiação a qual fornece a base para análise quantitativa e qualitativa por espectrofotômetro de absorção molecular.

## 2.2. Princípio da técnica

### 2.2.1. Espectro luminoso

A luz visível é a região do espectro eletromagnético, cujas radiações são capazes de sensibilizar a retina. A radiação visível compreende as radiações cujos comprimentos de onda estão situados entre 400 e 700nm, embora estes limites não sejam fixos em virtude da capacidade de percepção variar de acordo com o observador. Nesta faixa de comprimentos de onda, pode-se separar em subgrupos de acordo com a cor produzida em uma pequena faixa do espectro, como na tabela abaixo.

Tabela 1. Faixas de comprimentos de onda na região do visível

Intervalo de $\lambda$ (nm)	Cor
400 – 465	Violeta
465 – 482	Azul
482 – 487	Azul esverdeado
487 – 493	Turquesa
493 – 498	Verde azulado
498 – 530	Verde
530 – 559	Verde amarelado
559 – 571	Amarelo verde
571 – 576	Amarelo esverdeado
576 – 580	Amarelo
580 – 587	Laranja amarelado
587 – 597	Alaranjado
597 – 617	Laranja avermelhado
617 - 780	Vermelho

### 2.2.2. Processos de absorção

Partindo do princípio que a luz é uma forma de energia, a absorção de um fóton de luz por uma molécula resulta em um incremento de energia,  $\Delta E$ , na energia contida na molécula. A quantidade do incremento é exatamente igual à energia do fóton, que é  $\Delta E = h\nu$ . O processo de absorção é representado esquematicamente no diagrama de níveis de energia simplificada na figura 4.

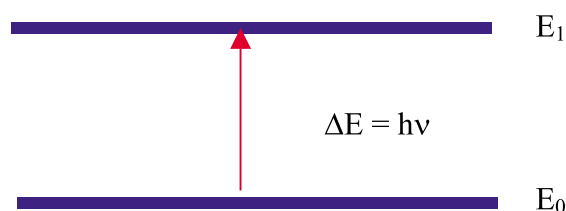
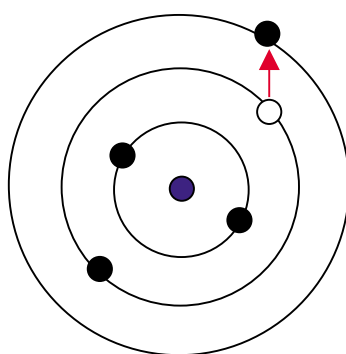


Figura 4. Diagrama de energia

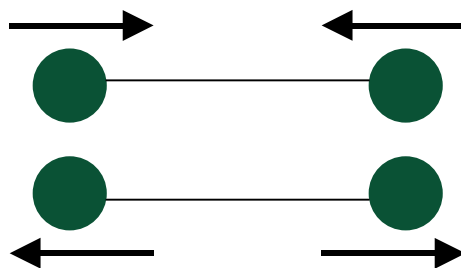
Se a molécula está inicialmente no estado normal ou estado fundamental,  $E_0$ , antes da interação, o processo de absorção aumenta a energia contida a um nível mais alto ou um estado excitado,  $E_1$ . O processo de troca de energia pela luz absorvida não é atenuado, mas ocorre na forma de múltiplas unidades de energia chamadas quantum. O quantum (hen) é característico para cada espécie absorvida. Para ser absorvido por uma molécula, o fóton de energia deve corresponder precisamente à diferença,  $\Delta E$ , entre os dois estados de energia.

O potencial energético total de uma molécula, excluindo a energia do núcleo, pode ser considerado como sendo a soma das energias eletrônicas, vibracional e rotacional. As energias eletrônicas estão associadas com transições de elétrons no interior do átomo ou molécula. Esta somatória de energias está representada na figura 5 como uma troca de orbitais.



**Figura 5. Energia eletrônica**

As energias vibracional e rotacional estão associadas com vibrações e rotações moleculares. Na figura 6, uma simples molécula diatômica é ilustrada no movimento de compressão e alongamento (vibração). Na figura 7 está exemplificada uma rotação molecular.



**Figura 6. Energia vibracional**



**Figura 7. Energia rotacional**

A diferença entre os estados de energia rotacional é relativamente pequena, muito menor do que as diferenças entre os estados de energia eletrônica. A diferença entre estados de energia vibracional é intermediária aos estados anteriores, conseqüentemente:

- Absorções associadas a transições entre níveis de energia rotacional são geralmente encontradas na parte de baixa energia ou alto comprimento de onda do espectro eletromagnético, ou seja, região do infravermelho afastado.
- Absorções associadas a transições entre níveis de energia eletrônica são encontradas na parte de energia alta, baixo comprimento de onda, ou seja, região de ultravioleta - visível do espectro eletromagnético.
- Absorções associadas a transições entre níveis de energia vibracional são encontradas entre os dois anteriores, na região do infravermelho.

Os vários tipos de transições de energia não são independentes, mas estão interligados. Estados de energia rotacional são sobre-posicionados nos estados vibracionais, e ambos estão sobre-posicionados nos estados eletrônicos.

### 2.2.3. Espectro de absorção UV - Vis

A presença de insaturações ou ligações múltiplas são amplamente reconhecidas como um processo característico da absorção ultravioleta, enquanto o composto saturado for transparente.

Na teoria molecular de orbitais, os elétrons envolvidos na formação de ligações simples como a ligação C - H são chamados de elétrons *sigma* ( $\sigma$ ). Ligações duplas como C = O envolvem elétrons *pi* ( $\pi$ ). Na região do infravermelho próximo, as transições envolvendo elétrons *pi* proporcionam uma melhor observação das bandas de absorção. Elétrons não ligados na molécula, contidos em átomos como oxigênio ou nitrogênio são chamados de elétrons *n*, e as interações entre elétrons *pi* e *n* são responsáveis por um grande número de bandas de absorção ultravioleta características.

Um cromóforo é um grupo no qual, quando introduzido um hidrocarboneto saturado, produz um composto o qual possui uma banda de absorção entre 180 e 1000nm. Por exemplo, n-octano é um hidrocarboneto saturado o qual é transparente nesta região, entretanto, se um grupo nitrila é introduzido no radical octil, o composto octil-nitrila é produzido. O grupo nitrila é classificado como um cromóforo e apresentaria sinais de absorção de luz na faixa no ultravioleta.

A tabela 2 ilustra um pequeno grupo de simples cromóforos com seus comprimentos de onda máximos e absorvidade molar. A absorvidade molar é a medida de intensidade da banda de absorção. Como se pode observar, a intensidade de absorção de diversos cromóforos varia acentuadamente de um grupo para outro. Entretanto, todos os membros de uma classe normalmente possuem bandas de absorção de igual intensidade e ocorrem em um faixa espectral relativamente estreita. Por exemplo, os dados mostrados para o ácido acético são típicos de ácidos carboxílicos saturados provenientes de ácido fórmico para ácido esteárico, C1 a C18, todos possuem bandas de absorção na região de 204 a 210nm e absorvidades molares de 40 a 75.

Tabela 2. Grupo de cromóforos

Grupo	Estrutura	Exemplo	$\lambda$ Max. (nm)	$\epsilon$
Carbonil (cetona)	RRC=O	Acetona	271	16
Carbonil (aldeído)	RHC=O	Acetaldeído	293	12
Carboxil	RCOOH	Ácido acético	204	60
Alceno	>C=C<	Etileno	193	10000
Nitrato	-ONO <sub>2</sub>	Etil nitrato	270	12
sulfóxido	>S=O	Cicloexil Metil Sulfóxido	210	1500

Se um ou mais cromóforos ocorrem em uma molécula, suas posições relativas determinam o efeito produzido no espectro. O 1-hexano possui uma absorvidade molar de 10000 em 180nm e 1,5-hexadieno possui uma absorvidade molar de 20000 no mesmo comprimento de onda. O 2,4-hexadieno, com banda em outra região, possui uma absorvidade molar de 25500 em 227nm.

A posição e a intensidade da banda de absorção do 1,5-hexadieno são aproximadamente o que nós podemos esperar de duas moléculas individuais de propileno. Obviamente, os dois grupos de cromóforos estão amplamente espaçados e não interagem. Entretanto, quando os dois cromóforos estão conjugados como no 2,4-hexadieno, o efeito não é o esperado de duas moléculas individuais.

Observações similares de um grande número de compostos têm realizado a argumentação básica para algumas regras gerais:

- Quando dois cromóforos em uma mesma molécula estão separados por mais de um átomo de carbono, o espectro de absorção é uma somatória simples do espectro de cada um dos depois cromóforos.
- Quando dois cromóforos em uma mesma molécula estão adjacentes, o máximo de absorção é encontrado em altos comprimentos de onda e a intensidade é incrementada.
- Quando dois cromóforos em uma mesma molécula estão ligados a um mesmo átomo de carbono, o resultado é intermediário entre os vistos anteriormente.

Na espectrofotometria de ultravioleta-visível, os compostos mais interessantes são usualmente os que possuem mais de um cromóforo, especialmente quando os cromóforos são conjugados (sistemas conjugados).

Os compostos com no mínimo dois cromóforos conjugados apresentam uma absorção na faixa do visível. Carboidratos saturados, gorduras, óleos, éteres simples, ácidos, a maioria dos carboidratos e proteínas não absorvem luz na faixa visível, já que suas estruturas não apresentam cromóforos. Moléculas com o mesmo cromóforo e com estrutura eletrônica similar apresentam espectros de absorção parecidos.

A presença de vários grupos cromóforos vizinhos modifica o caráter do espectro de absorção molecular. As possíveis resultantes podem ser divididas em 4 grupos:

- Efeito Batocromo. Deslocamento das bandas de absorção em direção à faixa vermelha do espectro, ocasionando uma intensificação da coloração.
- Efeito Hipsocromo. Deslocamento das bandas de absorção em direção à faixa violeta do espectro (de comprimento de onda menor).
- Efeito Hiperacromo. Aumento da intensidade das bandas de absorção.
- Efeito Hipocromo. Diminuição da intensidade das bandas de absorção.

Os auxocromos são grupos nos quais, quando introduzidos em um sistema como cromóforo, incrementam o comprimento de onda da banda de absorção máxima, que é, o efeito batocromo. Os auxocromos não possuem banda de absorção própria em baixos comprimentos de onda. Por exemplo, o grupo hidroxil é um auxocromo. Álcoois são transparentes e utilizados como solventes em baixos comprimentos de onda, entretanto, se um grupo Hidroxil é introduzido em um sistema contendo um cromóforo, isto causará um efeito batocromo. Os auxocromos típicos são os grupos de amina e seus derivados substituídos, halogêneos, grupo alcalino, e outros.

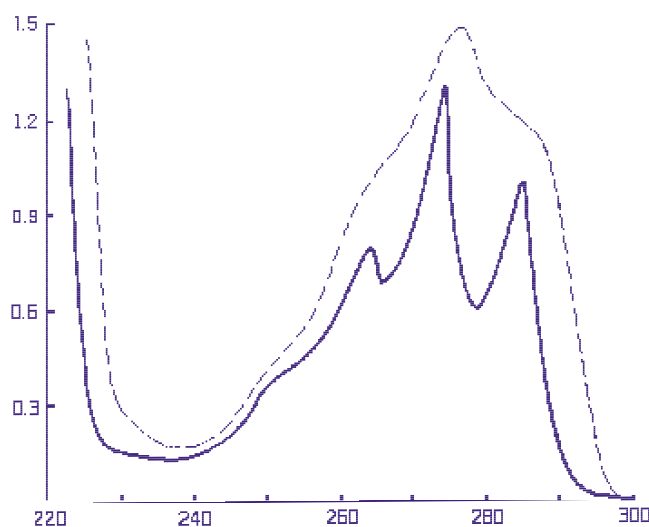
#### 2.2.4. Efeito de solventes

As análises espectrofotométricas na região do UV são realizadas geralmente em soluções. Habitualmente, trabalha-se em baixas concentrações do analito de interesse, e os solventes utilizados necessitam de um alto grau de pureza, já que devido a sua alta concentração em relação ao analito, suas impurezas podem provocar distorções nos resultados. Além disso, os solventes para a espectrofotometria UV devem possuir um alto grau de estabilidade óptica, não sendo aconselhável à utilização de solventes de grau de pureza comercial, que dificilmente preenchem os requisitos acima mencionados.

Os solventes mais usados na espectrofotometria de UV que devem ser elaborados especificamente para este fim, são os carboidratos saturados, como n-hexano, cujas absorções eletrônicas provocadas pelas transições dos elétrons se dão fora da faixa a ser analisada, também são utilizados solventes com heteroátomos, por exemplo, H<sub>3</sub>-COH-, que, devido às transições eletrônicas, só apresentam fracas bandas de absorção. Deve-se também enfocar este problema partindo-se do grau de polaridade do solvente.

As bandas de absorção de muitas substâncias são mais claras e podem mostrar estruturas finas quando a medição se dá em solventes de baixo momento bipolar. As interações solvente – soluto são muito mais fortes quando estão envolvidas fortes forças bipolares.

A figura 8 mostra dois espectros realizados com fenol em iso-octano e etanol, onde se pode observar a influência do solvente orgânico na determinação de substâncias.



**Figura 8.** Fenol em iso-octano (\_\_\_\_) e etanol (-----)

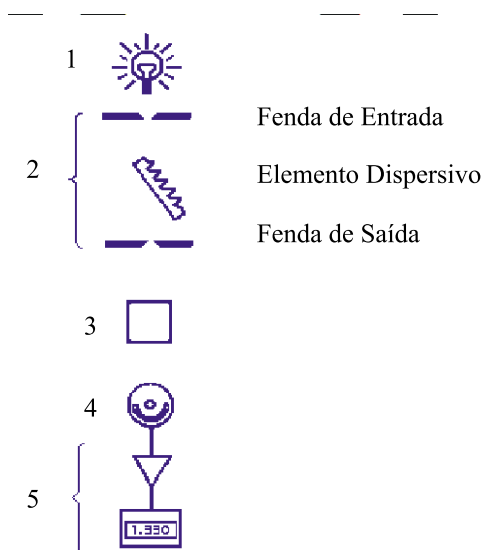
Uma diferença de pH também pode provocar variações, neste caso de deslocamento de comprimento de onda.



### 2.3. Descrição básica do sistema

O sistema, figura 9, que compreende um espectrofotômetro de UV-VIS é constituído por:

1. Fonte de luz
2. Monocromador
3. Compartimento de amostra
4. Detetor
5. Sistema de leitura



**Figura 9. Espectrofotômetro de UV-Vis**

#### 2.3.1. Fontes de radiação

A espectrofotometria de UV-Vis requer fontes capazes de produzir radiação contínua naquelas regiões espectrais de interesse. As fontes de energia radiante consistem de matéria que podem ser excitados por meio de aquecimento elétrico ou descarga de alta voltagem. No retorno aos níveis energéticos, os materiais excitados emitem fótons com energias correspondentes às diferenças entre as energias dos estados excitados e as energias dos estados fundamentais. Alguns materiais apresentam níveis energéticos tão numerosos e próximos que as frequências emitidas formam uma faixa de radiação contínua relativamente ampla.

As fontes de radiação utilizadas na construção de aparelhos para a prática da espectrofotometria UV-Vis devem preencher certos requisitos:

- A fonte deve fornecer feixe com suficiente potência radiante para permitir a detecção por meios adequados.

- A fonte deve gerar uma radiação contínua, isto é, contendo todos os comprimentos de onda, dentro da região espectral que o equipamento irá trabalhar.
- A fonte deve ser estável, ou seja, a potência do feixe luminoso gerado deve permanecer constante enquanto são realizadas as determinações. Em instrumentos de feixe simples, esta condição é essencial para que as medidas da absorvância possam ser reproduzíveis. Nos instrumentos de duplo feixe, estes são medidos simultaneamente, então, uma alta estabilidade da fonte não é tão crítica.

A fonte mais satisfatória para a obtenção de radiação contínua na região visível é a lâmpada de filamento incandescente de tungstênio com invólucro de vidro. O filamento opera a 2600-3000K, fornecendo radiação contínua de 350 a 2500nm. A energia emitida na região visível varia aproximadamente com a quarta potência da voltagem de operação; portanto, a fonte requer um rigoroso controle de voltagem para gerar radiação ou reguladores de voltagem eletrônicos.

As fontes de radiação ultravioleta mais usadas são as lâmpadas de descarga de hidrogênio ou deutério com janela de quartzo. O hidrogênio à baixa pressão e submetido à descarga elétrica produz um feixe contínuo na região do ultravioleta. A lâmpada de deutério produz um espectro contínuo de 180 a 380 nm.

As lâmpadas de xenônio de alta frequência trabalham produzindo pulsos de radiação que realizam a cobertura do espectro de 180 a 1100nm.

### **2.3.2. Monocromador (óptica)**

Os monocromadores são dispositivos construídos a base de redes de difração, que dispersam a radiação complexa em seus comprimentos de onda componentes, e então, isolam a faixa espectral desejada. Os monocromadores permitem isolar à vontade faixas de comprimentos de onda, espectralmente puras e muito estreitas, ao longo das regiões ultravioleta, visível e infravermelho próximas.

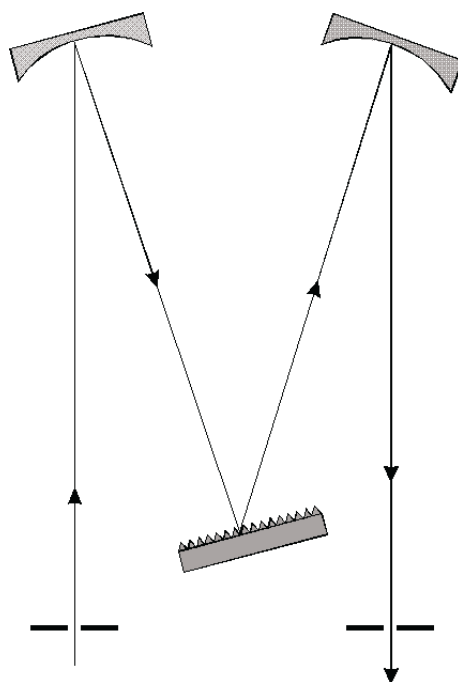
O desempenho fotométrico de um espectrofotômetro esta diretamente ligado a qualidade do monocromador (sistema óptico).

A configuração do monocromador deve proporcionar uma alta resolução do comprimento de onda analisado da amostra e ao mesmo tempo, uma maior quantidade de luz transmitida e baixa quantidade de luz espúria ( quantidade de luz que não foi devidamente isolada pelo sistema óptico).

A configuração do sistema óptico tem que permitir:

- Alta eficiência de transferência entre a fonte de luz e o monocromador.
- Adequada fenda de saída do monocromador para evitar a perda excessiva de luminosidade.
- Maior focalização do feixe da fonte de luz na amostra.

Na figura 10, abaixo, a ilustração de um monocromador normalmente utilizado na confecção de espectrofotômetros de UV-Vis.



**Figura 10. Monocromador “Czerny Turner”**

Além desta configuração, existem outras também usuais como: Littrow, Ebert e Concave Grating. Estas configurações de monocromadores poderão estar presentes nos seguintes tipos de espectrofotômetros de UV-VIS:

- Espectrofotômetros UV-VIS de Simple Feixe
- Espectrofotômetros UV-VIS de Arranjo de Diodos
- Espectrofotômetros UV-VIS de Duplo Feixe

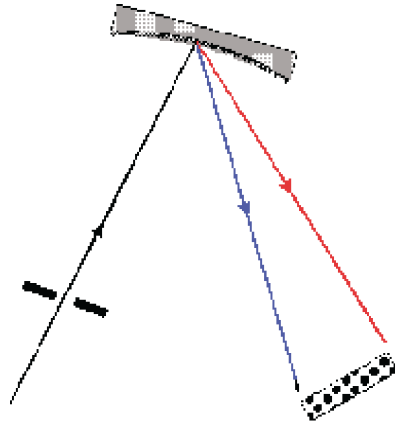
#### 2.3.2.1. Simple feixe

Neste tipo de espectrofotômetro, a dispersão do feixe de luz do monocromador é totalmente focalizada no compartimento da amostra e, conseqüentemente, a luz não absorvida direcionada ao sistema de detecção composto por um detector ; normalmente do tipo fotodiodo.

A construção de instrumentos de feixe simple requer componentes estáveis de alta qualidade no tocante à precisão. Os espectrofotômetros de leitura direta operam com precisão moderada, em torno de +/- 1% em transmitância; são instrumentos relativamente baratos, de operação simple e rápida e de fácil manutenção. O instrumento de feixe simple necessita incorporar um circuito de zero para a medida de transmitância, com a finalidade de melhorar a precisão de trabalho.

### 2.3.2.2. Arranjo de diodos

Este tipo de espectrofotômetro possui uma configuração simples de monocromador, figura 11, utilizando apenas uma grade de difração e um sistema de detecção composto por vários fotodiodos; um feixe de luz policromático inicialmente incide no compartimento de amostra e logo depois, a luz transmitida é direcionada ao monocromador, que após a dispersão da luz incide no sistema de detecção.

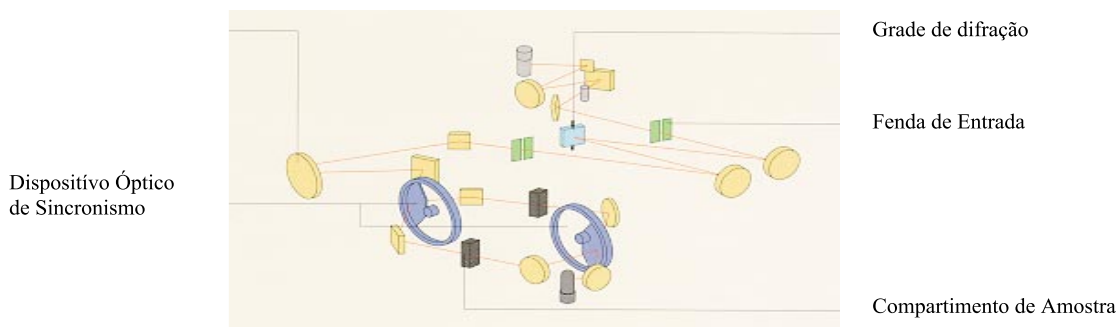


**Figura 11. Monocromador policromático**

### 2.3.2.3. Duplo feixe

Os espectrofotômetros de feixe duplo partem a radiação original no espaço (por meio de um espelho) ou no tempo (por meio de um espelho setorial rotativo). Este tipo de espectrofotômetro é normalmente empregado para análises que necessitam de maior precisão analítica. O feixe de luz disperso no monocromador (figura 12) é sincronizado por um dispositivo óptico, que fará com que o feixe incida ora em um compartimento da amostra (também chamado de feixe analítico), ora em outro compartimento de referência (também chamado de feixe de referência). A luz transmitida em ambos os compartimentos é sincronizada novamente ao sistema de detecção; com isto, poderemos eliminar interferências como: oscilações da fonte de energia, variações de tensão elétrica; bem como, do próprio solvente utilizado no preparo da amostra.

Desta maneira, flutuações na potência da fonte, resposta do detector e ganho do amplificador são compensados pela observação da diferença entre os sinais. Os espectrofotômetros de duplo feixe são mecânica e eletronicamente mais complicados do que os de feixe simples e, conseqüentemente, de construção e manutenção mais caras.



**Figura 12. Monocromador de duplo feixe**

### 2.3.3. Compartimento de amostras

O compartimento de amostras de espectrofotômetro UV-Vis possui uma grande variedade de conexões e acessórios que permitem uma ampliação nas aplicações possíveis do instrumento. O compartimento de amostras básico vem equipado com suporte de amostra retangular para cubeta de quartzo de 10mm. De acordo com a aplicação, é possível introduzir suportes de amostras para cubetas de tamanhos variáveis para cubetas de 1 a 100mm de comprimento.

#### 2.3.3.1. Acoplador de fibra óptica

Em muitas situações, utiliza-se o espectrofotômetro para medida de soluções do modo clássico, através de cubetas, mas existem amostras que apresentam uma grande dificuldade de análise em função de seu tipo ou tamanho. Para facilitar a análise destas amostras, pode-se utilizar um sistema acoplador de fibra óptica onde alguns benefícios são obtidos:

- Previne a manipulação de amostras, as quais possuam alta temperatura e/ou pressão, ou apresentam níveis de radiação.
- Realiza medidas em amostras muito pequenas, como cristal, ou amostras muito grandes como janelas de estruturas metálicas, as quais são impossíveis de serem feitas em configurações normais de instrumentos.
- Monitoramento em processos químicos.
- Determinações em sistemas fechados (reatores).

Uma série de sensores de fibra óptica são possíveis de serem utilizados para atingir os objetivos acima, como sensores de reflectância, absorbância, transmitância em vidros, e fluorescência.

#### 2.3.3.2. Sipper

Um sistema composto por bomba peristáltica pode ser utilizado para bombear a solução da amostra para uma cubeta de fluxo, sem a necessidade de transferência manual da amostra para a cubeta, diminuindo assim, a manipulação da amostra. Estas cubetas de fluxo podem estar posicionadas em suportes especiais que podem realizar o aquecimento da amostra.

#### 2.3.3.3. Suporte para amostras sólidas

Este tipo de suporte tem por objetivo permitir a realização de obtenção de resultados analíticos em amostras sólidas que possuam transparência, como vidros, plásticos e lentes. De fácil conexão ao instrumento, este suporte pode possuir também uma versão na qual a amostra transparente caminha em frente ao feixe óptico com a finalidade de obter-se um perfil de homogeneidade da amostra.

Um dispositivo rotatório pode ser utilizado para verificar o comportamento desta mesma amostra sólida e transparente, mas com ângulos distintos de radiação incidentes.

#### 2.3.3.4. Acessórios de reflectância

Amostras sólidas que não sejam transparentes pode ser analisadas e o perfil (espectro de reflectância) da amostra pode ser obtido. Existem diversos tipos de acessórios de reflectâncias disponíveis e que podem ser acoplados aos espectrofotômetros, como por exemplo: reflectância especular, reflectância difusa, reflectância à temperatura e pressão controladas, reflectância de pós e cremes e comparação de coloração de amostras sólidas.

#### 2.3.4. Aquisição de dados

Os dispositivos fotossensíveis usados nos instrumentos para a medida da transmitância convertem a energia radiante em um sinal elétrico. Os detectores fotossensíveis devem responder à energia radiante em uma faixa espectral ampla. Eles devem ser sensíveis a baixos níveis de iluminação e responder rapidamente à radiação incidente. É essencial que o sinal elétrico produzido seja diretamente proporcional à potência do feixe incidente, isto é,

$$R = kP + k'$$

Em que R é a resposta elétrica do detector em unidades de corrente, resistência ou f.e.m. A constante k é uma medida da sensibilidade do detector em termos da resposta elétrica por unidade de potência radiante. Certos detectores acusam uma pequena resposta k', chamada corrente escura, mesmo quando não estão recebendo radiação incidente. Os detectores de energia radiante usados atualmente na construção de instrumentos de medida são fotodiodos ou fotomultiplicadoras.

Os sinais detectados pela fotomultiplicadora ou fotodiodos após amplificados, geram um gráfico de comprimento de onda por intensidade de transmitância ou absorbância, chamado de espectro de ultravioleta-visível. Com este espectro é possível sua identificação comparando-se a um espectro de uma substância padrão ou a obtenção da quantificação, fixando-se um comprimento de onda e obtendo o respectivo valor de transmitância ou absorbância. Este valor será proporcional à concentração do componente presente na amostra e fazendo-se uso de um padrão de concentração conhecida, é determinada sua concentração real.

#### 2.4. Requisitos mínimos de instalação e operação

---

Para garantir a obtenção de resultados confiáveis e estar em conformidade com os requerimentos da Qualificação de Instalação (IQ), é necessário que os requisitos de instalação e operação sejam cumpridos; neste caso, podemos citar o seguinte:

- Rede elétrica: que atenda as especificações do fabricante, com atenção especial na estabilização da rede elétrica.
- Instrumento localizado em condições devidas de umidade e temperatura.  
Conhecimento operacional do instrumento para utilizá-lo corretamente.

## 2.5. Cuidados básicos

---

Os cuidados a serem tomados com relação ao instrumento para preservar a vida útil e desempenho do mesmo estão relacionados a dois grupos de atividades que são: atividades a serem executadas pelo usuário e atividades referentes a manutenção preventiva normalmente executadas pelo fabricante. Estaremos abordando nesta seção as atividades a serem exercidas pelo usuário, sendo que as atividades a serem exercidas pelo fabricante estão descritas na seção verificação de desempenho.

As atividades que são realizadas no dia a dia pelo usuário são de fundamental importância para a atenuação de danos que podem ser causados ao instrumento. Estas atividades normalmente são simples e podem ser resumidas em:

- Limpeza externa do instrumento.
- Limpeza do compartimento de amostras.
- Lavagem das cubetas.
- Consultar os manuais / fornecedor do instrumento para eliminar dúvidas de operação / manutenção.
- Limpeza das janelas de quarto que fazem a interface dos feixes de luz com o compartimento de amostras.
- A utilização de material de segurança durante o manuseio de amostras no instrumento é essencial para a segurança do operador. O material de proteção individual necessário é composto por: avental e segurança, luva cirúrgica, e óculos de proteção com visão ampla.

O instrumento deve possuir itens de consumo, para que, se necessário o próprio operador possa executar atividades como troca de lâmpadas. Os principais itens de consumo necessários para estarem junto ao instrumento são:

- Lâmpadas de deutério e tungstênio, ou lâmpada de xenônio.
- Cubeta de quartzo.

### 3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC)

#### 3.1. Introdução

Cromatografia em fase gasosa é uma técnica analítica utilizada para separar mistura de substâncias químicas. O objetivo da técnica é obter uma separação que ajude a identificar e quantificar as substâncias presentes na mistura.

Como principal elemento utilizado na técnica de cromatografia em fase gasosa (GC), as primeiras colunas cromatográficas utilizadas eram constituídas de um empacotamento em um tubo de comprimento típico entre 1 a 5 m, e de diâmetro de 2 a 4 mm. Com o avanço da instrumentação analítica, atualmente utiliza-se tubos abertos de sílica fundida (capilares) com comprimentos variados entre 10 a 100 m, e diâmetros internos entre 0,1 a 0,8 mm, proporcionando melhores resultados.

#### 3.2. Princípio da técnica

A amostra é introduzida no sistema através de uma seringa ou uma válvula de injeção. Esta amostra é volatilizada, logo após a sua introdução no sistema de cromatografia e dissolvida em um gás de arraste inerte (fase móvel). Dissolvida no gás, esta amostra será arrastada até a coluna cromatográfica, que contém uma fase líquida ou sólida como fase estacionária, ocorrendo a separação dos compostos nesta coluna. A separação ocorre porque os componentes da amostra têm diferentes afinidades com a fase estacionária, resultando em diferentes velocidades de eluição dos componentes pela coluna, ou seja, quanto maior a afinidade do componente pela fase estacionária, mais lentamente ele caminha pela coluna e vice-versa.

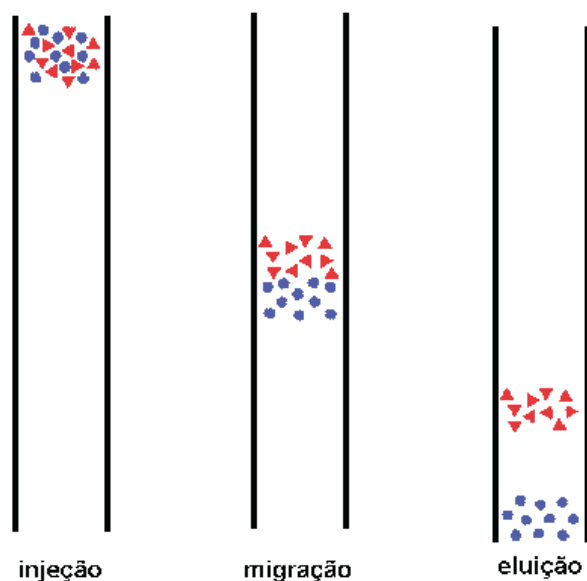


Figura 1. Esquema básico de um processo de separação cromatográfica



Após os componentes da amostra serem separados, chegam ao detector, que gera um sinal elétrico, através de um fenômeno físico-químico (como p.ex., diferença de condutividade térmica, ionização através de uma chama). Estes detectores podem ser seletivos para um grupo químico determinado (p.ex. organo-clorados), podendo ser mais sensíveis para a análise dos mesmos. Este sinal é amplificado, pois geralmente está em uma intensidade muito baixa, e transmitido para uma estação de dados, onde se visualiza este sinal em um gráfico de intensidade de sinal em função de tempo. Este gráfico é denominado cromatograma. O sinal é proporcional à concentração ou à massa de cada composto, sendo que pode haver respostas diferentes de composto para composto (nem sempre o composto que tem mais quantidade gera o maior sinal). Daí a possibilidade de se quantificar a amostra.

O GC permite a análise de diversos tipos de substâncias, desde alguns gases inorgânicos como O<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e etc, como também milhares de substâncias orgânicas de diversos grupos funcionais, como p.ex., álcoois, cetonas, aminas, aromáticos e outros. Com o uso de detectores altamente seletivos, é possível determinar quantidades muito pequenas dos componentes em questão na amostra, como p.ex., na ordem de picogramas (nível de traços), como também pode se determinar em quantidades maiores, como p.ex., na ordem de porcentagem.

### **3.3. Descrição básica do sistema**

---

Os módulos que constituem um sistema básico são os seguintes:

- 1. Sistema de gases: Os gases mais utilizados como fase móvel (gás de arraste) são o hélio, o hidrogênio, o argônio e o nitrogênio. Outros gases podem ser utilizados. O uso de gases auxiliares se faz necessário, dependendo do detector a ser utilizado.
- 2. Controladores de fluxo e de pressão: São utilizados para manter a uniformidade da vazão da fase móvel. Além disso, são utilizados também para medir a razão de divisão da amostra (splitter), quando do uso dos injetores para colunas capilares e também para o controle de vazão dos gases auxiliares dos detectores.
- 3. Injetores: Local onde a amostra é efetivamente introduzida no sistema. Os injetores podem ser para colunas empacotadas ou para colunas capilares, sendo que existem diferentes técnicas para o seu uso (on-column, flash vaporization, split, splitless, etc). Também pode ser feito o uso de válvulas de amostragem, principalmente para gases. A automação pode ser utilizada para aumentar a produtividade e reprodutibilidade.
- 4. Colunas: Nelas ocorre a separação das substâncias presentes na amostra. Podem ser confeccionadas em vidro, aço inox, níquel, teflon ou sílica fundida e podem ser empacotadas ou capilares. As capilares proporcionam melhores separações.
- 5. Detectores: São dispositivos que monitoram a saída da substância eluída da coluna, gerando um sinal elétrico proporcional à massa ou à concentração desta substância. Podem ser universais ou seletivos. Estes detectores estão ligados a amplificadores de sinal, chamados eletrômetros, os quais amplificam o sinal e o transmitem para os dispositivos de saída de dados.
- 6. Sistema de aquisição e processamento de dados: Local onde se faz a aquisição dos dados gerados no cromatógrafo, executa os cálculos necessários para a quantificação das substâncias e gera-se o cromatograma. Podem ser integradores ou softwares de integração (PC).

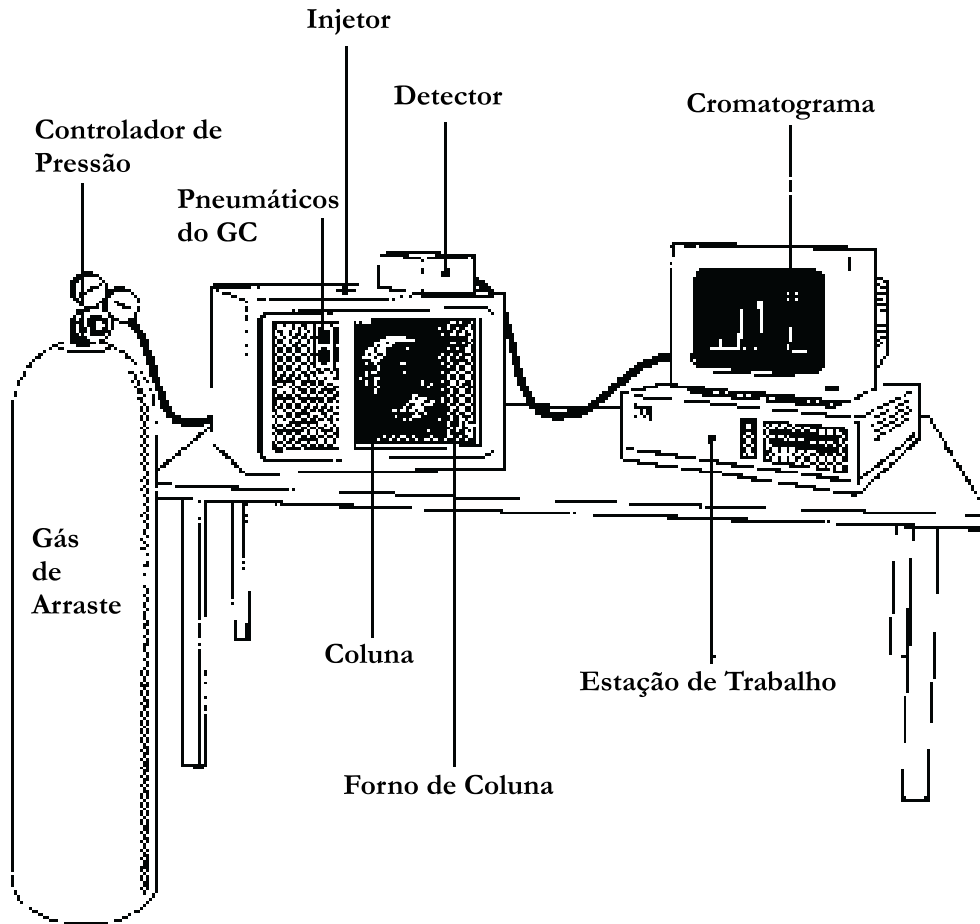


Figura 2. Sistema de cromatografia em fase gasosa (GC)

### 3.3.1. Gases utilizados

Existem duas classes de gases que podem ser utilizados no sistema cromatográfico: os gases de arraste (fase móvel) e os gases auxiliares.

Como gás de arraste, os mais utilizados são o nitrogênio, argônio, hidrogênio e o hélio. O gás mais indicado é o hélio, pois apresenta melhor desempenho cromatográfico que os outros gases, porém alguns fatores são decisivos na escolha do gás de arraste como:

- Compatibilidade com o detector: É necessário analisar se o gás de arraste é compatível com o detector e este pode causar perda de sensibilidade ou ruído excessivo. P.ex., para a análise de gás Hidrogênio no TCD, o Nitrogênio e o Argônio conferem maior sensibilidade do que o Hélio, pois a diferença de condutividade térmica entre os dois primeiros e o Hidrogênio é maior que a diferença de condutividade térmica entre o Hidrogênio e o Hélio;
- Custo;
- Disponibilidade;
- Desempenho;
- Pureza: Deve-se respeitar a pureza dos gases, dependendo da aplicação. Os manuais dos fabricantes contêm as informações necessárias.

### 3.3.2. Controladores de fluxo e pressão

O fluxo ou a pressão do gás de arraste é um parâmetro importante que depende do diâmetro e do comprimento da coluna. Deve ser controlado durante a análise. Para este controle são utilizadas válvulas controladoras de fluxo ou pressão. O ajuste deste parâmetro pode ser feito manualmente, com o auxílio de um medidor de fluxo ou um bolhômetro, ou eletronicamente, através de software, cujo objetivo é obter a melhor eficiência cromatográfica.

Para os gases auxiliares é necessário fazer o controle, pois o ajuste do fluxo é fundamental para atingir o melhor desempenho.

### 3.3.3. Injetores

A função básica de um injetor é introduzir a amostra no sistema cromatográfico. No injetor a amostra entra em contato com o gás de arraste e se dissolve no mesmo. Para isso, no caso de amostras líquidas, é necessário que o injetor esteja aquecido, tal qual que, garanta a total volatilização da amostra.

Existem dois tipos de classes de injetores, os injetores para colunas empacotadas e os injetores para colunas capilares. Para amostras gasosas, a injeção pode ser feita com o auxílio de uma válvula de amostragem de gás, que pode ter ou não, um injetor em série com a válvula.

Para cada classe de injetores, existem opções dependendo da aplicação.

#### 3.3.3.1. Injetores empacotados

São utilizados, como o nome diz, com colunas empacotadas. Podem ser utilizados para colunas capilares do tipo megabore (com diâmetro interno de coluna  $> 0,53$  mm). Toda a amostra é injetada diretamente na cabeça da coluna cromatográfica. Com isso é eliminada toda e qualquer perda da amostra na transferência para a coluna. É o injetor indicado para amostras limpas, diluídas e com grande variação de volatilidade dos compostos presentes.

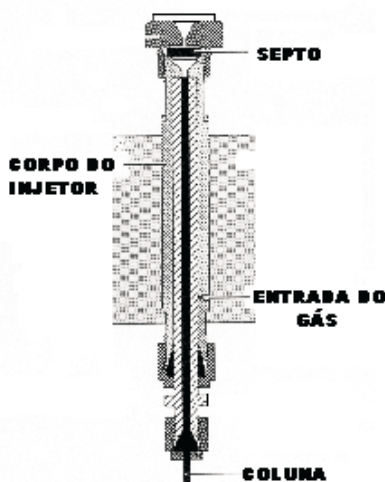


Figura 3. Injetor empacotado

3.3.3.2. Injetores capilares

São injetores desenhados para o uso de colunas capilares. Os principais injetores são:

- Injetor Split/Splitless: São os injetores mais utilizados. Permitem que se faça uma divisão da amostra, a fim de que se possa trabalhar com as colunas capilares, pois estas têm uma capacidade de receber uma pequena quantidade de amostra. Existem dois modos de operação:
- Modo split – A amostra injetada é dividida entre a coluna e a saída para descarte do injetor (vent). A válvula que executa esta divisão é chamada de splitter e é utilizada para amostras concentradas (em nível de mg/mL).

Modo splitless – Utilizado para amostras diluídas. Neste caso, o splitter permanecerá fechado durante a transferência do soluto para a coluna, após isso o splitter é aberto para o descarte do solvente.

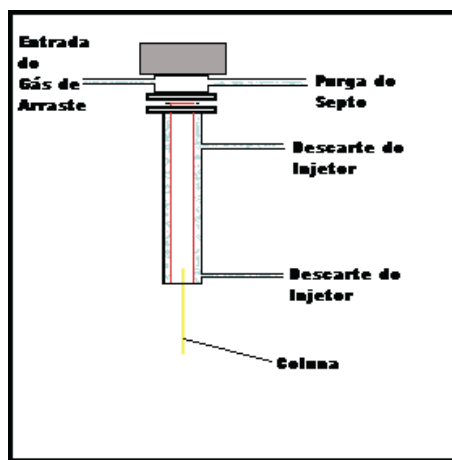


Figura 4. Injetor split/splitless

- Injetor on-column e/ou com temperatura programável: Permite dois modos de operação:
- Injeção on-column - Para amostras com larga faixa de peso molecular, eliminando o efeito de discriminação de massa.
- Injeção on-column com temperatura programável – Para amostras termolábeis, com baixa temperatura de ebulição ou com baixas concentrações. Conhecido no mercado como Injetor PTV ou SPI.

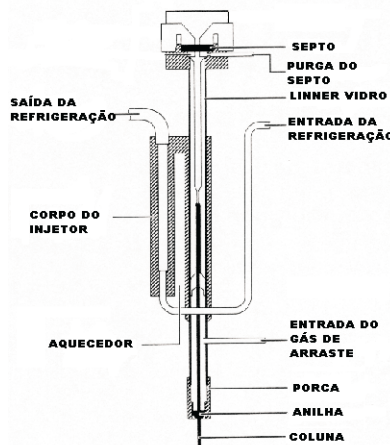


Figura 5. Injetor com temperatura programável

### 3.3.4. Colunas

A coluna é a principal parte do sistema cromatográfico, pois é nela que ocorre a separação dos componentes presentes na amostra, pois através das diferentes afinidades das substâncias com a fase estacionária, migrando com velocidades diferentes pela coluna. Podem ser classificadas em dois grupos:

- Colunas empacotadas: São as colunas mais antigas de cromatografia. Geralmente são fabricadas em tubos de aço inox ou vidro, podendo ser empregados outros materiais na sua confecção. Na parte interna deste tubo recebe um recheio que pode ser um adsorvente ou um suporte sólido impregnado com um filme de uma substância que tenha baixa pressão de vapor. Hoje em dia, são pouco utilizadas, devido ao menor desempenho em relação às colunas capilares, sendo mais utilizadas em análise de gases inorgânicos.

Colunas Capilares: São as colunas mais utilizadas atualmente. São geralmente fabricadas em tubos de sílica fundida, recobertos de um filme de poliamida na parte externa do tubo, o que dá grande flexibilidade à coluna. A fase estacionária é depositada na parede interna, podendo ser um filme, ou um adsorvente sólido. Este tipo de coluna tem grande capacidade de separação e grande variedade de substâncias que se podem separar por cada tipo de coluna. A escolha da fase determina a seletividade da coluna. Centenas de fases estacionárias estão disponíveis no mercado, as quais têm diversos nomes no mercado. Geralmente são escolhidas de acordo com a polaridade das substâncias que se irá analisar. Fases estacionárias polares geralmente são mais reativas, sendo assim com temperatura limite de trabalho menor que as apolares.



Figura 6. Tipos de colunas capilares

Para escolher a coluna mais adequada, deve-se analisar os seguintes parâmetros:

- Comprimento e diâmetro interno das colunas;
- Espessura do filme (capilar);
- Fase estacionária líquida;
- Suportes Sólidos;
- Fases Estacionárias Sólidas.

### 3.3.4.1. Forno de colunas

O forno é o local onde fica armazenada a coluna cromatográfica. Para cada tipo de análise deve-se estabelecer uma temperatura de trabalho do forno ao qual os componentes de interesse de uma amostra apareçam separados e com eluição num menor tempo possível.

Um bom forno tem precisão de medida e grande variedade de programação de rampa. A utilização de criogenia possibilita a análise de compostos mais voláteis.

### 3.3.5. Detectores

Existem diversos tipos de detectores, os universais (Condutividade Térmica (TCD), Espectrometria de Massas (MS)), e os considerados seletivos ou até específicos (Ionização de Chama (FID), Captura de Elétrons (ECD), Termo-iônico (TSD) ou Nitrogênio-Fósforo (NPD), Fotométrico de chama (FPD ou PFPD)) e outros.

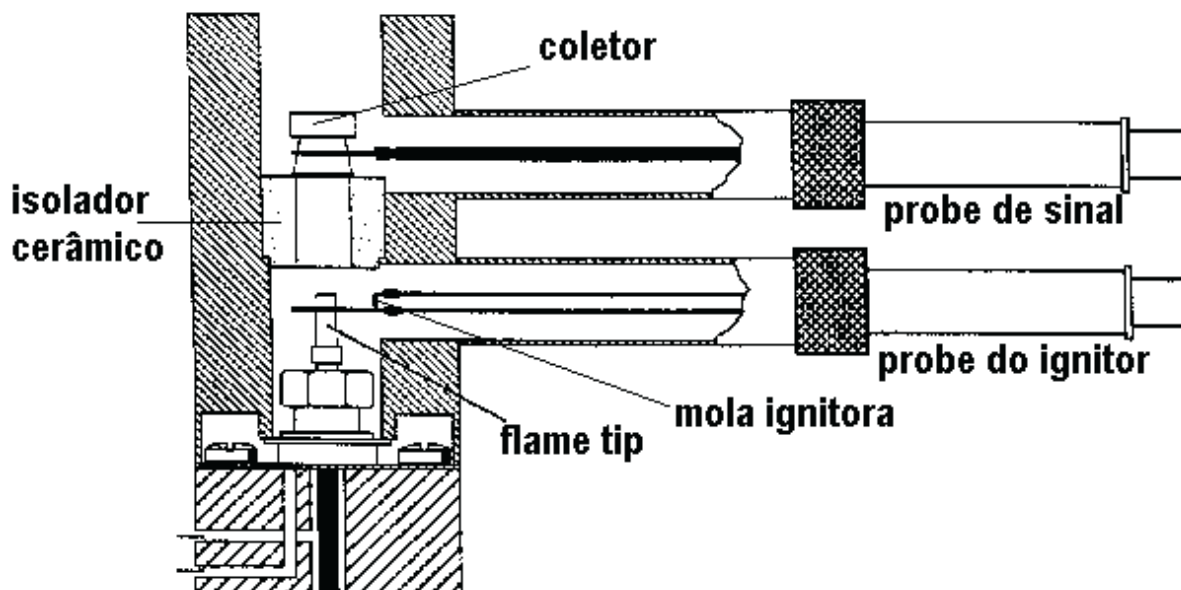
**Tabela 1. Tipos de detectores e sua utilização**

Detector (Tipo)	Mínimo detectável	Faixa Linear	Aplicações
FID (fluxo de massa)	$10^{-12} - 10^{-13} \text{ g C s}^{-1}$	$10^6 - 10^7$	Compostos contendo C e H
TSD ou NPD (fluxo de massa)	N: $2 \times 10^{-13} \text{ g N s}^{-1}$ P: $10^{-13} \text{ g P s}^{-1}$	N: $10^5$ P: $10^4$	N e P
FPD ou PFPD (fluxo de massa)	$10^{-10} - 10^{-11} \text{ g S s}^{-1}$ $10^{-12} \text{ g P s}^{-1}$	S: $10^2$ P: $10^3$	S e P (+ 26 elementos da tabela periódica)
ECD (concentração)	$10^{-13} - 10^{-14} \text{ g lindano}$	$10^4$	Halogenados e estruturas específicas de dupla ligação e triplas
TCD (concentração)	$10^{-9} - 10^{-10} \text{ g/ml}$	$10^4 - 10^6$	Todos os compostos
PID (concentração)	$10^{-11} \text{ g benzeno}$	$> 10^4$	Aromáticos Fenóis

Serão apenas abordados os mais utilizados em cromatografia em fase gasosa (GC).

#### 3.3.5.1. Detector de ionização de chama (FID)

Este detector é o mais utilizado, apresentando simplicidade operacional, alta sensibilidade, e incomparável linearidade. O desenho abaixo apresenta um esquema do detector FID.



**Figura 7. Detector FID**

A operação do detector envolve uma mistura de gases, ar e hidrogênio formando uma chama com temperatura a cerca de 2000°C, onde a amostra é queimada. Um par de eletrodos fica nas proximidades da chama coletando sinal gerado pela formação de espécies ionizadas e elétrons oriundos da queima de substâncias na chama.

Este detector gera sinal para compostos que tenham carbono e hidrogênio na molécula, com raras exceções como, por exemplo, CS<sub>2</sub>.

O detector deve trabalhar aquecido até uma temperatura aproximada de 400° C, porém a temperatura escolhida deve garantir que não haja condensação das substâncias eluídas da coluna.

Concentrações típicas a serem analisadas abrange a faixa de baixos valores (ppb) até altos valores (%).

#### 3.3.5.2. Detector de nitrogênio e fósforo (NPD) ou termo-iônico específico (TSD)

O detector tem resposta seletiva para compostos contendo átomos de nitrogênio ou fósforo, possuindo internamente um sal de rubídio incorporado em uma pérola refratária submetida à passagem de gases ar e hidrogênio, e a pérola quando aquecida eletricamente produz um plasma gasoso à temperatura de 600 a 900°C.

A formação deste plasma é suficiente para que substâncias contendo N e P dêem resposta ao detector.



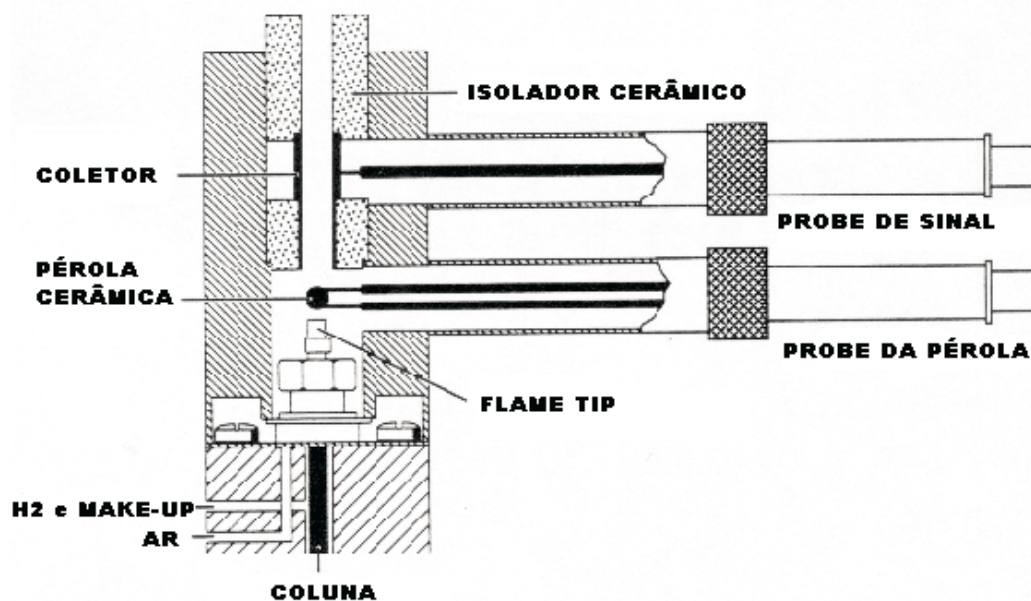


Figura 8. Detector TSD ou NPD

### 3.3.5.3. Detector de captura de elétrons – ECD

Este detector é sensível a moléculas que apresentam átomos com muita afinidade eletrônica e possui no seu interior uma fonte radioativa comumente de <sup>63</sup>Ni a qual é um emissor de partículas beta. Estas partículas causam ionização do gás de arraste, normalmente nitrogênio, e produz uma nuvem de elétrons dentro da célula do ECD. Os elétrons produzem uma corrente de background estável através dos eletrodos da célula do ECD. Este sinal é amplificado pelo eletrômetro do detector. Quando uma espécie absorvente de elétrons passa pela célula, há uma diminuição de corrente, pois os elétrons são capturados pela espécie absorvente, diminuindo o número de elétrons na célula.

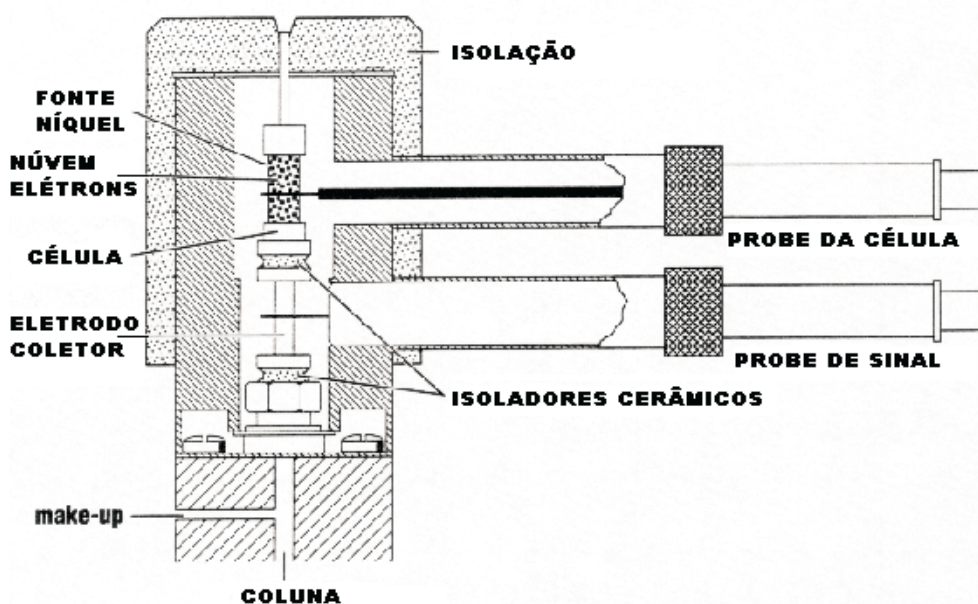


Figura 9. Detector ECD



### 3.3.6. Aquisição e processamento de dados

A aquisição e processamento de dados foram tratados no item 4.6 da técnica de HPLC.

### 3.4. Requisitos mínimos de instalação e operação

Para garantir a obtenção de resultados confiáveis e reprodutivos e estar em conformidade com os requerimentos de Qualificação de Instalação (IQ), é necessário que se verifique as condições que se tem no local para executar a instalação. Para isso podemos citar as seguintes condições:

- Rede elétrica: É necessário verificar se a rede elétrica possui a voltagem apropriada para a especificação do equipamento. A estabilização da rede e a posição dos pinos da tomada (fase invertida) devem ter atenção especial, pois ambas podem influir na operação e vida útil do equipamento.
- Condições ambientais: O instrumento deve ser instalado somente se no local houver condições devidas de Umidade e Temperatura para o seu funcionamento. Além disso, condições de segurança devem ser observadas como a proximidade de agentes inflamáveis e corrosivos.
- Pureza dos Gases: Devem estar de acordo com as necessidades do sistema cromatográfico, principalmente em relação aos detectores.
- Filtro de Gases: Devem ser utilizados para garantir a qualidade dos gases utilizados e das linhas de gases do sistema. Devem ser trocados periodicamente.
- Reguladores de Pressão: Devem garantir as pressões mínimas de trabalho especificadas do equipamento. Também devem ter dispositivos de segurança como duplo estágio e diafragmas metálicos.
- Conhecimento operacional do equipamento: Para a utilização correta do equipamento.

**Tabela 2. Pureza dos gases**

Detector	Pureza	Observações
Conductividade Térmica (TCD) Gás de arraste p/ o Injetor_: He, N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , Ar Gás do make up: He, N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , Ar	99,999%	He : 3 ppm H <sub>2</sub> O; 5 ppm O <sub>2</sub> . Filtro de gás de arraste recomendado.
Captura de Elétrons (ECD) Gás de arraste p/ o Injetor: He, N <sub>2</sub> Gás do make up : N <sub>2</sub>	99,999%	N <sub>2</sub> : 0,02 ppm H <sub>2</sub> O; 1 ppm O <sub>2</sub> . Filtros de gás de arraste e oxigênio recomendado.
Ionização de Chama (FID) Gás de arraste p/ o Injetor: He, N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> Gás p/ o detector: H <sub>2</sub> Ar sintético Gás do make up : He, N <sub>2</sub>	99,999% 99,999% Ar respirável	Teor de hidrocarbonetos controlados Filtro de gás de arraste recomendado.
Nitrogênio e Fósforo (NPD) ou Termo-iônico Específico (TSD) Gás de arraste p/ o Injetor: He, N <sub>2</sub> Gás p/ o detector: H <sub>2</sub> Ar sintético Gás do make up: He, N <sub>2</sub>	99,999% 99,999% Ar respirável	Filtro de gás de arraste recomendado.
Fotométrico de Chama (FPD ou PFPD) Gás de arraste p/ o Injetor: He, N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> Gás p/ o detector: H <sub>2</sub> Ar sintético Gás do make up : N/A	99,999% 99,999% Ar respirável	Filtro de gás de arraste recomendado.

### 3.5. Cuidados básicos

---

Para a garantia de bons resultados, são necessários alguns cuidados com o GC, que geralmente são procedimentos simples, porém importantes para o bom funcionamento do equipamento.

Um dos cuidados mais comuns é o da troca do septo do injetor, a qual deve ser feita tipicamente entre 30 a 100 injeções executadas dependendo da técnica de injeção utilizada (manual ou automática). O insersor de vidro do injetor também representa um item de grande importância para o bom desempenho do equipamento, desta forma sua substituição é necessária e a frequência deve ser determinada em função da aplicação e utilização.

Outro cuidado importante se refere a utilização das colunas, que devem ser condicionadas, e serem submetidas a uma limpeza térmica sempre que necessária. Deve-se tomar cuidado para não aquecer a coluna a uma temperatura acima do limite térmico da fase estacionária.

Quanto aos gases, além dos cuidados de pureza conforme mencionado nos pré-requisitos, é importante realizar a substituição dos filtros de gases quando necessário e também verificar regularmente a pressão no cilindro evitando sua utilização até seu término, a fim de evitar uma eventual contaminação causada pela entrada de ar ambiente por difusão.

Nos detectores, é recomendada uma limpeza a cada seis meses ou sempre que houver queda de desempenho. Os procedimentos desta limpeza estão descritos nos manuais de operação do equipamento.

## 4. CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA (LC)

### 4.1. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) surgiu como a aplicação de cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para a cromatografia gasosa.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ocupa atualmente uma posição de destaque entre os métodos modernos de separação, pois é considerada indispensável, sendo a diferença entre a cromatografia líquida e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10, 5 ou 3mm) esféricas, de preferência. Estas fases, por serem muito menos permeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel.

### 4.2. Princípio da técnica

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferenças entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, e no alargamento de bandas, que é dependente de processos físicos e não da diferença de equilíbrio. Estas interações podem ser realizadas por meio de interações do tipo pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras.

A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio dos analitos entre as duas fases imiscíveis e é determinada pelos fatores que afetam este equilíbrio: Composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura da separação. Mudanças em qualquer um destes fatores levam a alterações na migração diferencial.

A classificação da cromatografia líquida de acordo com a fase estacionária levou a uma grande variedade de tipos. A primeira grande divisão feita foi cromatografia de adsorção e cromatografia de partição, referindo-se às fases estacionárias sólida e líquida, respectivamente. Levando-se em conta a natureza das interações e os fenômenos acima descritos, os modos de separação podem ser classificados em: Cromatografia em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons (troca iônica) e por exclusão.

No caso das fases estacionárias serem líquidas, estas podem estar simplesmente adsorvidas sobre um suporte sólido ou imobilizadas sobre ele. No primeiro caso, a cromatografia é referida como cromatografia de partição.

A cromatografia de partição perdeu espaço para a cromatografia de fases quimicamente ligadas, devido à maior estabilidade conferida por estas quando comparadas com as fases líquidas adsorvidas. Estas fases, com suportes modificados, são consideradas à parte por diferirem dos outros dois modos em seu mecanismo de separação.

O grande desenvolvimento cromatográfico obtido a partir das fases líquidas quimicamente ligadas fez com que estas sejam as fases majoritariamente usadas em HPLC analítico.

#### 4.2.1. Modos de separação:

Existe sempre uma dependência entre as interações soluto-fase móvel, soluto-fase estacionária, e fase móvel fase-estacionária. Desta forma, a escolha do modo de separação depende da escolha da fase estacionária e da fase móvel, para cada classe de soluto.

Dois modos de retenção em cromatografia líquida foram propostos. O primeiro Scott e Kucera, interação-solvente, e o segundo por Snyder, competição-solvente. Os dois modelos são equivalentes, uma vez que ambos consideram que, em uma dada separação, a interação do soluto com a fase estacionária permanece constante. Portanto, a retenção é determinada pela composição da fase móvel.

##### 4.2.1.1. Cromatografia em fase normal

A fase estacionária é mais polar que a fase móvel; o oposto ocorre em cromatografia no modo reverso. Os solventes usados são geralmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água. As fases estacionárias são adsorventes orgânicos (sílica, alumina) ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, fenil, amino).

Os dois modelos de retenção, interação-solvente e competição-solvente têm sido usados com sucesso para descrever o efeito da fase móvel em cromatografia líquida no modo normal. Independentemente do modelo usado, a retenção em fase normal aumenta com o decréscimo da polaridade da fase móvel.

A aplicação majoritária deste modo de cromatografia se dá com moléculas neutras, embora possa ser utilizada também para a separação de moléculas ionizáveis ou iônicas.

A ordem de eluição respeita a seguinte seqüência: moléculas hidrofóbicas (menos polares) são eluídas primeiro, ao passo que moléculas hidrofílicas (mais polares) são mais retidas.

Quando a dissolução da amostra apresenta problemas em solventes polares, a injeção em fase reversa é dificultada, sendo recomendada a separação em fase normal.

O solvente para a eluição no modo normal é selecionado escolhendo-se um solvente fraco e misturando-o com um solvente forte para conseguir a força desejada.

A presença de traços de água na fase móvel é a causa mais comum da pobre reprodutibilidade na retenção, quando se trabalha com fase normal, especialmente quando se usa sílica não-modificada como fase estacionária. Este problema tem sido resolvido trabalhando-se com solventes anidros com um volume conhecido de água, metanol ou ácido acético para desativar os grupos silanóis mais reativos da fase estacionária. Além de melhorar a reprodutibilidade, melhora também o formato do pico. O mesmo efeito pode ser obtido, adicionando-se trietilamina, essencial na separação de aminas em sílica gel.

O uso de sílicas quimicamente modificadas em eluição no modo normal tem sido preferido, uma vez que elas oferecem sítios de interação com o soluto, além de uma superfície mais homogênea em comparação com a sílica gel, que tem uma variedade de grupos silanóis de diferentes polaridades. As fases quimicamente ligadas são úteis para a cromatografia de compostos moderadamente polares. Entretanto, estes solutos podem também ser eficientemente resolvidos no modo reverso de eluição, e a escolha entre eluição no modo normal ou reverso é, usualmente, mais dependente da matriz que do soluto.

#### 4.2.1.2. Cromatografia em fase reversa

Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, no modo reverso a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é mais utilizada em HPLC, uma vez que permite a separação de uma grande variedade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente utilizada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessária, substituída por metanol ou tetrahidrofurano (THF). O uso de apenas estes três solventes deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis em água. Já no modo normal, há uma maior variedade de solventes disponíveis.

O princípio da separação em fase reversa é a hidrofobia e deve-se principalmente à interações entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa.

É importante ressaltar que a força do solvente em fase reversa aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente. Assim, temos que a força da água (solvente mais fraco) menor que a do metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano e diclorometano, observada a ordem crescente (vide tabela 1). O diclorometano, por não ser solúvel em água, não é usado em fase reversa, mas por ser um solvente muito forte é, às vezes, usado para limpar as colunas de fase reversa que tenham sido contaminadas por solutos fortemente retidos.

**Tabela 1. Comparação entre forças de diferentes fases-móveis**

<b>Solvente</b>	
Hexano, Heptano	0,00
Cloroformio	0,26
Diclorometano	0,30
Éter etílico	0,38
Metil t-butil éter	0,48
Acetato de etila	0,48
Dioxano	0,51
Acetonitrila	0,52
THF	0,53
1 ou 2-propanol	0,60
Matanol	0,70

A Acetonitrila, além de poder ser usada em uma baixa faixa de absorção no ultravioleta, apresenta soluções aquosas com baixa viscosidade, o que é desejável. Deste modo, juntamente com metanol e THF, estes são os solventes mais usados para controlar a seletividade e separação no modo reverso de eluição.

Quando, por algum motivo, não se usa água na fase móvel, e utiliza-se fases estacionárias apolares, a cromatografia é dita cromatografia não-aquosa de fase reversa. Ela só é usada quando se trabalha em solutos muito hidrofóbicos, como lipídios e polímeros, e o solvente normalmente consiste em uma mistura de solventes polares, como acetonitrila ou metanol (solvente A), com um solvente mais fraco (B), como THF, clorofórmio, diclorometano, acetona, metil-t-butil éter. A retenção, neste caso, também é alterada pelo percentual do solvente B.

Existem outras modalidades de cromatografia de compostos iônicos ou cromatografia de exclusão por tamanho (permeação e filtração em gel, aplicadas a separações de moléculas por tamanho, como por exemplo, polímeros, biopolímeros, proteínas, peptídeos, etc) e por razão da pequena aplicação em separações de fármacos e medicamentos, não serão discutidas neste trabalho.

Outro aspecto importante envolvendo as separações cromatográficas em HPLC é o modo de separação: isocrático ou gradiente. No modo isocrático as condições de separação permanecem inalteradas durante toda a corrida cromatográfica, ficando restrita a uma única composição de solvente. No modo gradiente há uma variação na composição da fase móvel e/ou no fluxo durante a corrida cromatográfica.

Existem vários parâmetros importantes a serem considerados durante o desenvolvimento de um método cromatográfico, como resolução cromatográfica, seletividade, fator de retenção, etc. Estes parâmetros são de extrema importância no desenvolvimento, validação e utilização de métodos cromatográficos em HPLC.

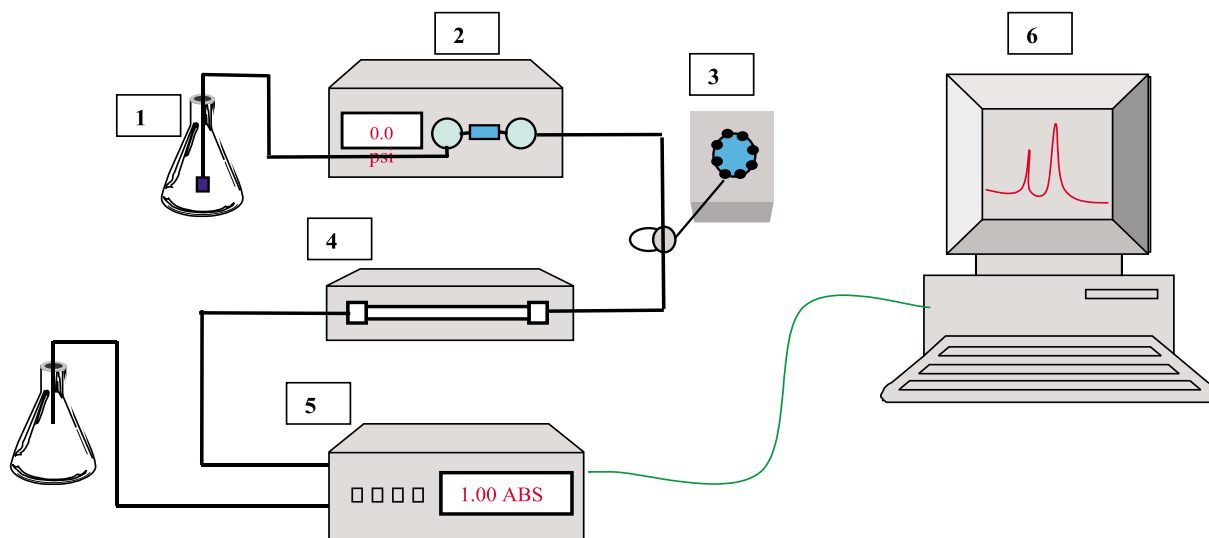
### **4.3. Descrição básica do sistema**

---

Um sistema de HPLC é basicamente composto por módulos com funções específicas e cuidadosamente projetados para proporcionar versatilidade, rapidez, reprodutibilidade e alta sensibilidade às análises a que se destina.

Os sistemas de HPLC, atualmente existentes no mercado, podem variar desde os mais simples, onde as injeções das amostras são feitas manualmente, até os mais complexos, com módulo de amostragem automática e controlados por computadores com softwares capazes de controlar as funções do sistema, adquirir, processar e imprimir os dados, mantendo-os de forma organizada para futuras referências.

Para uma melhor compreensão de um sistema de HPLC, podemos dividi-lo em seis módulos principais:



**Figura 1: Representação esquemática de um sistema de HPLC:**

1. Reservatório da fase móvel
2. Sistema de bombeamento de solventes (Bomba)
3. Introdução da amostra (Injetor)
4. Compartimento para coluna
5. Sistema de detecção
6. Sistema de dados

#### 4.3.1. Fase móvel

A fase móvel utilizada em cromatografia líquida é de extrema importância para a obtenção de uma separação desejada, pois, tem contacto com o analito que esta sofrendo separação, bem como com a coluna cromatografica e o sistema como um todo.

Há uma grande variedade de solventes utilizados, no entanto, existem algumas propriedades desejáveis para seu uso em HPLC:

- Alta pureza;
- Não decomposição do analito e da fase estacionária;
- Compatibilidade com o sistema de detecção;
- Baixa viscosidade;
- Dissolução da amostra;
- Baixo custo.

Dentre os solventes utilizados para a cromatografia líquida, o que vem merecendo bastante atenção quanto a suas características e pureza tem sido a água, sendo desejável a utilização de água ultrapura, permitindo uma maior confiabilidade nos resultados. Sua resistividade é uma excelente indicação de qualidade sendo tipicamente 18.2 MO/cm a 25°C. Entretanto, os compostos orgânicos devem ser

monitorados uma vez que podem interferir na sensibilidade dos detectores UV muito utilizados em análises por HPLC. Outro fator importante é a utilização desta água sempre imediatamente, já que o armazenamento da mesma modifica a condição de água ultrapura.

#### 4.3.2. Sistema de bombeamento de solventes

A principal função da Bomba é impulsionar a fase móvel através da coluna.

Como as colunas possuem recheio compactado, composto por partículas de diâmetro muito pequeno, da ordem de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , elas oferecem uma grande resistência a passagem da fase móvel, portanto, o sistema de bombeamento deverá ser capaz de ultrapassar esta barreira e proporcionar um fluxo constante, reprodutivo e sem pulsações.

A maioria das bombas utilizadas são do tipo recíprocas, também chamadas de bombas de pistão ou diafragma. Seu funcionamento baseia-se em um motor elétrico conectado a engrenagens que movimentam um sistema de pistões.

Devido ao fato deste tipo de bomba produzir fluxos pulsantes, decorrentes do movimento de “ida e volta” do(s) pistão (pistões), alguns recursos foram desenvolvidos para contornar este problema, estes mecanismos são chamados de amortecedores de pulso.

As Bombas analíticas atuais são projetadas para operar em altas pressões e em taxas de fluxo que variam entre 0,01 a 10 mL/min. São normalmente construídas de material inerte como aço inoxidável nas cabeças de bombeamento, tubulações e conexões, safira, quartzo, cerâmica ou titânio nos pistões, rubi nas válvulas de fluxo (check valves) e materiais inertes nos diversos selos de vedação existentes.

#### 4.3.3. Introdução de amostra – injetor

O injetor é o módulo no qual as amostras serão introduzidas no sistema de HPLC para que seja realizada a separação na coluna.

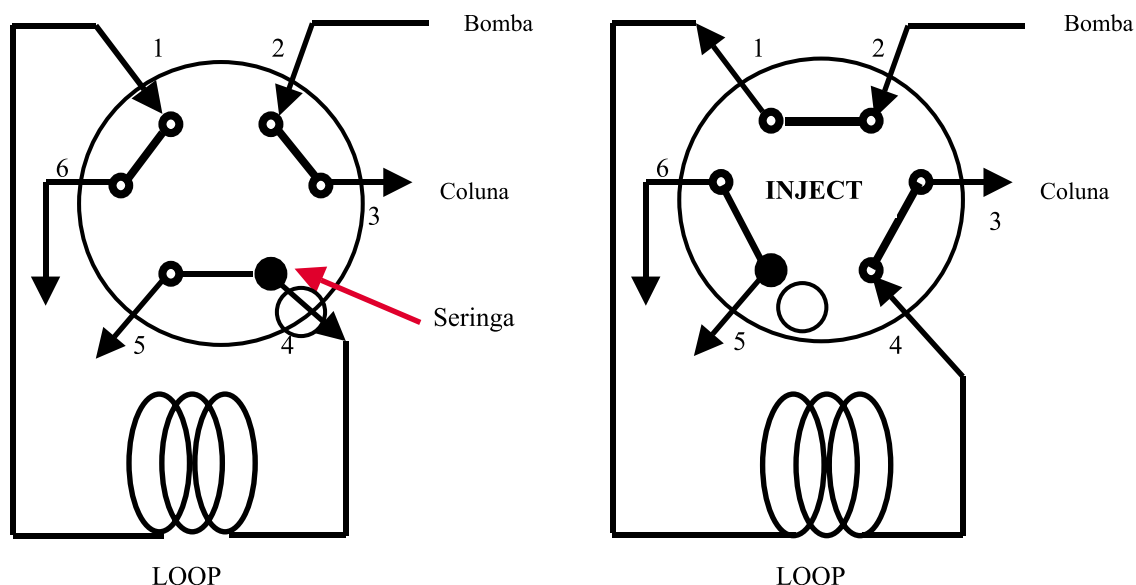
O injetor pode ser manual, onde o usuário introduz a amostra com o auxílio de uma microseringa de ponta reta, ou automático, também chamado auto-injetor ou amostrador automático o qual é capaz de injetar um grande número de amostras automaticamente e até mesmo realizar operações de diluição, derivatização ou adição de reagentes.

##### 4.3.3.1. Injetor manual

Os injetores manuais mais utilizados são basicamente do tipo válvula, os quais possuem uma alça de amostragem externa (loop), que nada mais é do que tubulação de volume definido e preciso que pode ser substituída para permitir a injeção de diferentes volumes de amostra.

A figura 2 mostra o diagrama esquemático da válvula. Os seis círculos menores representam os orifícios internos da válvula, enquanto que o círculo maior representa a porta de entrada da agulha da seringa de injeção.





**Figura 2. Diagrama esquemático de uma válvula de injeção**

A Válvula possui duas posições: carregamento (LOAD) e injeção (INJECT). Na posição LOAD, o fluxo da bomba é desviado direto para a coluna (entra em 2 e sai em 3). Enquanto isto, a amostra é introduzida na alça de amostragem (LOOP) pelo orifício da agulha, sendo o excesso imediatamente descartado pela saída 6, ou seja, a precisão de injeção é determinada pelo volume de amostra no LOOP.

Na posição INJECT, a fase móvel agora segue através do LOOP arrastando a amostra para a coluna (percurso 2-1-4-3).

#### 4.3.3.2. Injetor automático

Os injetores automáticos são dispositivos amplamente utilizados em laboratórios que buscam alta produtividade, pois trabalham de maneira não assistida além de proporcionarem melhor reprodutibilidade em relação aos injetores manuais. Alguns modelos possuem a capacidade de termostatar as amostras, aumentando a versatilidade do sistema cromatográfico.

#### 4.3.4. Colunas

##### 4.3.4.1. Fases estacionárias à base de sílica

A sílica é sem dúvida o material mais importante utilizado nas fases estacionárias para HPLC. É um material versátil, podendo ter sua superfície modificada por derivação química, sendo que desta forma pode dar origem a diversos materiais muito interessantes como fases estacionárias para cromatografia líquida, pois possibilita o trabalho com diferentes mecanismos de separação.

A sílica é uma forma amorfa, altamente porosa e parcialmente hidratada, preparada usualmente pela hidrólise ácida do silicato de sódio, seguida por emulsificação em uma mistura álcool/água e subsequente condensação, quando então é lavada e seca para o uso.

A superfície da sílica é função de suas condições de preparação, sílicas com grande número de silanóis livres são mais ácidas que as sílicas com grupos hidroxilados ligados.

A sílica é bastante utilizada em cromatografia em fase normal, não sendo recomendada para o uso em fase reversa.

#### 4.3.4.2. Fases quimicamente modificadas

São as fases mais utilizadas na atualidade, pois sua aplicação a separações de compostos polares foi amplamente difundida devido à dificuldade que se tinha com a utilização das colunas à base de sílica.

Com o advento das fases quimicamente ligadas, esta lacuna pode ser preenchida e atualmente pode-se afirmar que aproximadamente 90% das separações cromatográficas sejam realizadas com a utilização destas fases, que possuem um mecanismo interessante de retenção de solutos por interações que não se baseiam apenas em polaridade.

A utilização de grupos octadecil leva à formação de fase octadecilsilano, conhecida como ODS ou  $C_{18}$  sendo que este grupo confere à fase um caráter apolar em relação à sílica não modificada.

A retenção nestas fases é dependente da quantidade de carbono presente, geralmente expressa em porcentagem. Desta porcentagem e da quantidade de silanóis residuais dependerá a qualidade da separação a que se aplica.

Esta derivação, por razões estéricas, não atinge todos os grupos silanóis. Os grupos restantes, em alguns casos, ao interagir com o soluto, causam problema de cauda nos picos. Este problema pode ser eliminado reagindo-se sílica, após a derivação, com trimetilclorosilano que, por ser menor, tem acesso a alguns destes grupos, formando trimetilsilanos. Embora não seja possível a derivação de todos os grupos silanóis, este processo é chamado capeamento (end capping).

Algumas análises requerem estabilidade de temperatura de coluna e, para isto, estão disponíveis no mercado dispositivos para este fim, e são conhecidos como forno ou compartimento de coluna.

#### 4.3.5. Detectores

Detectores são os dispositivos transdutores que estão ligados logo após a saída da coluna e são responsáveis por gerar os sinais elétricos proporcionais aos compostos que por ele passam. Vários tipos de detectores têm sido usados em HPLC dependendo das características físicas ou físico-químicas da amostra e da fase móvel. Um detector ideal deve possuir as seguintes características:

- Alta sensibilidade e baixo limite de detecção;
- Resposta rápida a todos os solutos;
- Insensibilidade a mudanças de temperatura e na vazão da fase móvel;
- Resposta independente da fase móvel;
- Pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da célula do detector;
- Resposta que aumente linearmente com a quantidade de soluto;
- Não destruição do soluto;
- Segurança e conveniência para o uso;
- Informação qualitativa do pico desejado;
- Baixo custo.

Dificilmente todas estas características podem ser encontradas em um único detector, portanto, deve-se escolher o detector mais adequado à amostra e que reúna maior número das características citadas.

Os detectores disponíveis no mercado mais utilizados são:

- Detectores de absorvância no ultravioleta e visível (UV-VIS);
- Detectores de fluorescência;
- Detectores eletroquímicos;
- Detectores de massas.

Outros:

- Detectores de índice de refração;
- Detectores de condutividade elétrica.

#### 4.3.5.1. Detectores de UV-VIS

Estes detectores funcionam baseados na quantidade de luz que é absorvida pelo soluto em um determinado comprimento de onda característico da mesma. Podem ser divididos em três tipos basicamente:

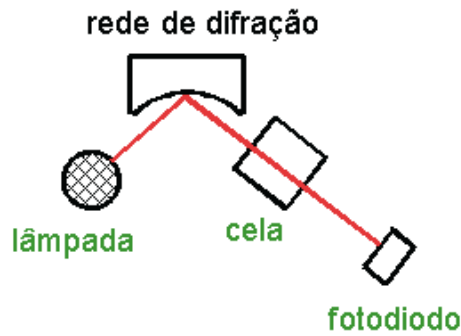
- de comprimento de onda fixo;
- de comprimento de onda variável;
- de arranjo de diodos.

##### 4.3.5.1.1. Detectores de comprimento de onda fixo

São os mais simples de todos e não são muito comuns de se encontrar atualmente, pois são sensíveis às variações de composição de fase móvel que compromete seu uso em sistemas de gradiente. O comprimento de onda é selecionado através de filtros ópticos de comprimento de onda específicos.

#### 4.3.5.1.2. Detectores de comprimento de onda variável

São os mais utilizados atualmente por possibilitar seu uso, tanto em sistemas isocráticos quanto em gradiente. São utilizados pela maioria dos laboratórios nos quais a amostra e seu respectivo comprimento de onda são conhecidos. A figura 3 mostra o diagrama esquemático de um detector de comprimento de onda variável

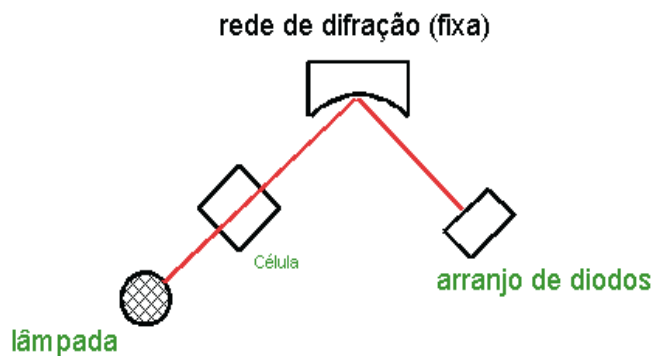


**Figura 3. Diagrama esquemático de detector de comprimento de onda variável**

#### 4.3.5.1.3. Detectores de arranjo de diodos

São detectores que têm a capacidade de gerar espectros de absorvância em uma velocidade compatível com o fluxo do eluente. Fornece dados em três dimensões: absorvância x tempo x comprimento de onda. São utilizados em pesquisa e desenvolvimento quando não se conhece qual é o melhor comprimento de onda, deseja-se obter seu espectro para sua caracterização (biblioteca) e obtenção da porcentagem de pureza de picos.

O diagrama esquemático é ilustrado na figura 4.

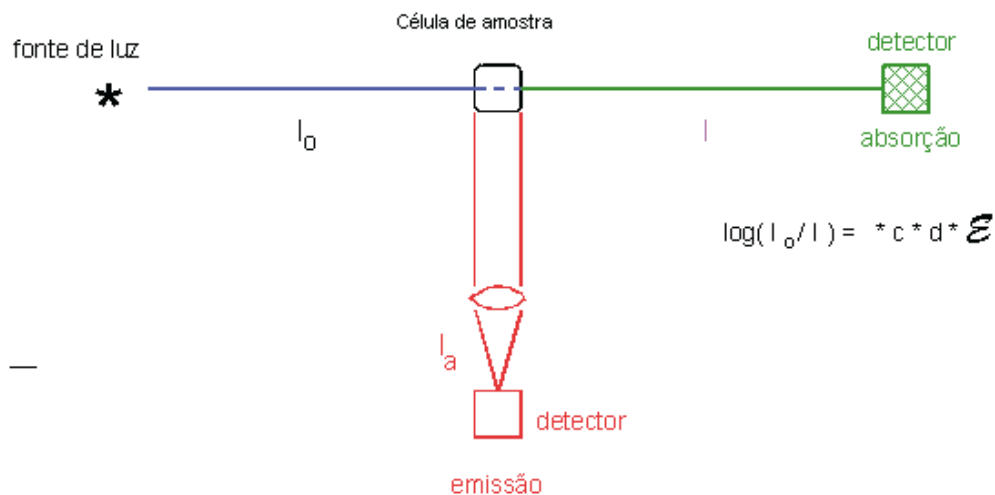


**Figura 4. Diagrama esquemático de um detector de arranjo de diodos**

#### 4.3.5.2. Detector de fluorescência

Os detectores de fluorescência são específicos, pois o soluto tem que fluorescer e é um dos mais sensíveis dentre os mais utilizados em HPLC.

Na figura 5 é apresentado um diagrama esquemático deste tipo de detector.

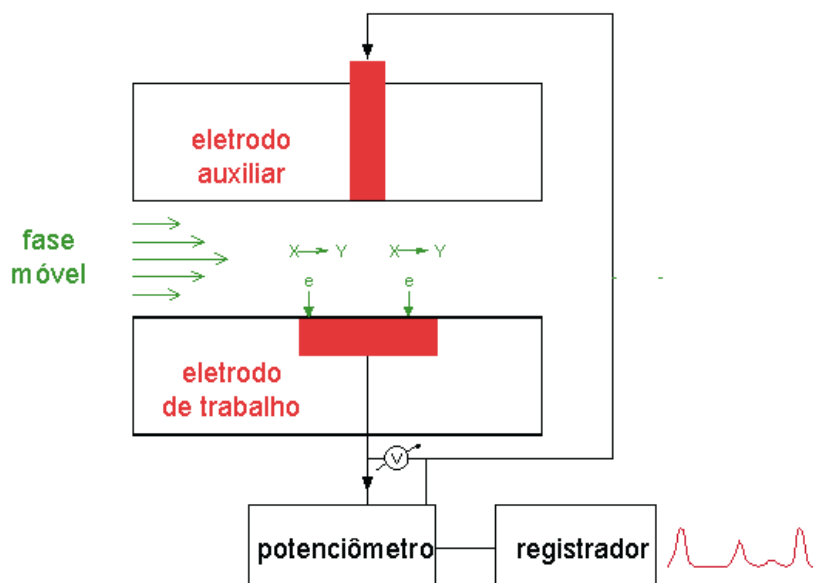


**Figura 5. Esquema do detector de fluorescência**

Existem detectores de fluorescência no mercado que têm a capacidade de gerar espectros de fluorescência de excitação e emissão durante a corrida cromatográfica.

#### 4.3.5.3. Detectores eletroquímicos

São os mais sensíveis dentre os detectores e também os mais delicados para se trabalhar. As moléculas a serem analisadas devem possuir características que possibilitem a oxidação ou a redução. A detecção é efetuada através de eletrodos conforme ilustra a figura 6.



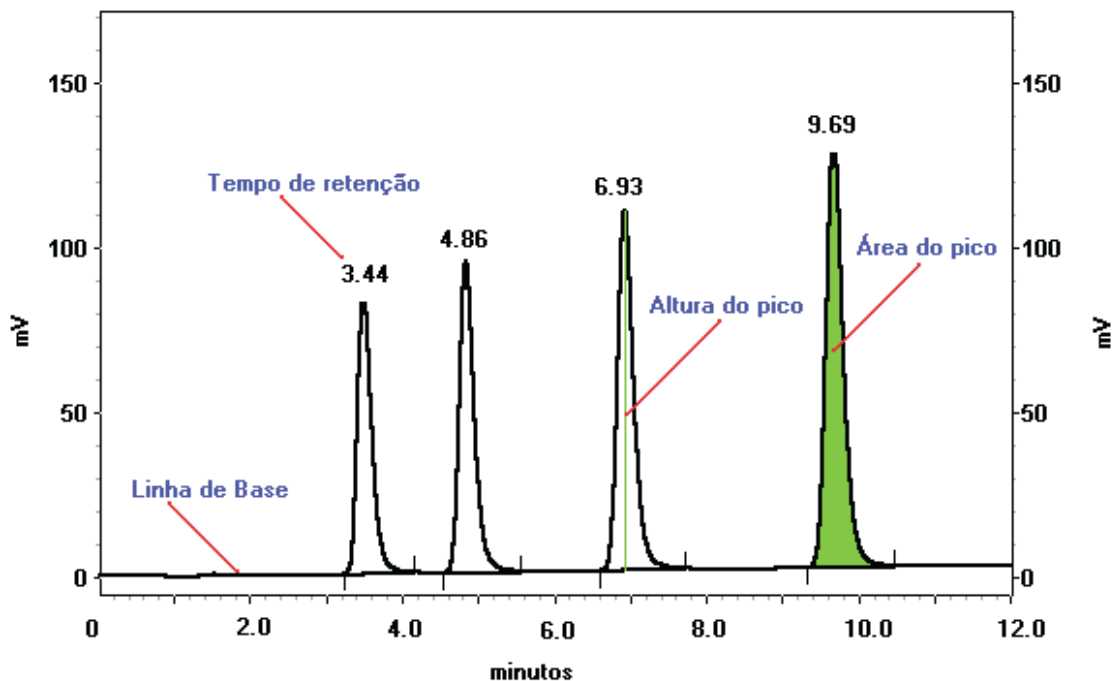
**Figura 6. Diagrama esquemático de um detector eletroquímico**

#### 4.3.6. Aquisição e processamento de dados

Como parte integrante do cromatógrafo, o sistema de aquisição e processamento de dados permitirá ao usuário verificar e documentar os resultados obtidos.

Basicamente deverá receber o sinal elétrico enviado pelo(s) detector(es), convertê-lo(s) em gráfico(s) denominado(s) cromatograma(s), fazer a integração dos picos através de parâmetros pré-estabelecidos e, a partir de uma curva de calibração, quantificar suas amostras.

Este gráfico traçado como sinal em função do tempo de retenção apresenta duas características importantes. A primeira, o tempo de retenção é característico e repetitivo para cada substância; a segunda, a área ou altura do pico é diretamente proporcional à concentração ou massa da substância. Veja a figura abaixo:



Inicialmente é criado um arquivo que contém todas as informações necessárias para análise das substâncias de interesse, tais como:

- Elaboração de texto descrevendo condições cromatográficas como fase móvel e coluna utilizados;
- Programação de parâmetros para integração dos cromatogramas.

Após estabilização do sistema, padrões são injetados para verificação de desempenho.

Visto que está tudo em ordem, um padrão contendo todos os componentes a serem quantificados é injetado para que possa ser criada uma tabela onde o sistema é “informado” sobre os picos a serem analisados através de seus respectivos tempos de retenção. Esta tabela é necessária para a criação de uma curva de calibração.

A seguir, os padrões para elaboração desta curva são injetados e a mesma é armazenada, finalizando a criação deste arquivo de análise.

As amostras devem ser injetadas tomando-se o cuidado de injetar padrões de controle em intervalos regulares, possibilitando a verificação da estabilidade do sistema.

A seguir será feita uma abordagem sobre os quatro métodos que podem ser utilizados para calibração:

- Porcentagem de Área.
- Normalização de Área.
- Padrão Externo.
- Padrão Interno.

#### 4.3.6.1. Porcentagens de área

A porcentagem de área é o método mais simples de cálculo, pois não requer padrão.

É baseado no princípio de que a resposta do detector é proporcional à quantidade de substância que passa pela célula do mesmo.

Só pode ser utilizado para substâncias que têm a mesma resposta no detector, ou seja, se injetadas quantidades iguais das mesmas, deve-se obter áreas iguais para todos os picos. O cálculo para a amostra é o seguinte:

$$\text{Conc. do componente A (\%)} = \frac{\text{Área do componente A}}{\sum \text{Áreas de todos os componentes}} \times 100$$

#### 4.3.6.2. Normalização de área

O princípio é o mesmo da porcentagem de área, porém se faz a correção da resposta do detector para cada substância, utilizando um dos picos como referência de cálculo. Para esse método é necessária a injeção de um padrão para o cálculo do fator de resposta de cada pico como na fórmula abaixo:

$$\text{Fator de resposta do componente A} = \frac{\text{Área do componente A}}{\text{Conc. do componente A}} \times \frac{\text{Conc. do componente de Referência}}{\text{Área do componente de Referência}}$$

Tendo o fator de resposta de cada componente, podemos analisar a amostra utilizando a seguinte equação:

$$\text{Concentração do componente A (\%)} = \frac{\text{Área do componente A} \times \text{Fator resposta do componente A}}{\sum (\text{Áreas de todos os componentes} \times \text{Fat. resp. todos comp.})}$$

#### 4.3.6.3. Padrão externo

O padrão externo é o método mais comum de calibração.

Consiste em fazer a quantificação da amostra através da injeção de padrões com concentrações conhecidas.

Faz-se a relação da área do padrão com a concentração e se obtém o fator de resposta para cada composto, conforme equação abaixo:

$$\text{Fator de resposta do componente A} = \frac{\text{Área do componente A}}{\text{Concentração do componente A}}$$

Com este fator de resposta gerado após injeção do padrão, injeta-se a amostra.

Com a área gerada na amostra, divide-se esta área pelo fator de resposta gerado pelo padrão e obtém-se a concentração da amostra através da equação:

$$\text{Concentração do componente A} = \frac{\text{Área do componente A}}{\text{Fator de resposta do componente A}}$$

#### 4.3.6.4. Padrão interno

O padrão interno é o método mais preciso de calibração, pois corrige as variações de volume através de uso de um padrão de referência, que é adicionado na mesma quantidade tanto no padrão como na amostra.

A escolha deste padrão de referência deve obedecer as seguintes condições:

- Não deve estar presente na amostra;
- Não haver nenhum componente na amostra que tenha tempo de retenção muito próximo ao padrão;
- Ser puro, não reativo e de preferência ser do mesmo grupo funcional do componente a ser determinado.

Por estas condições, muitas vezes não é possível utilizar este método, porém quando utilizado produz resultados bem precisos, mesmo utilizando injeção manual.

O cálculo consiste em determinar o fator de resposta relativa de cada componente, com a injeção do padrão, através da equação:

$$\text{Fator de resposta do componente A} = \frac{\text{Área do componente A}}{\text{Conc. do componente A}} \times \frac{\text{Conc. do padrão interno}}{\text{Área do padrão interno}}$$



Com os fatores de resposta calculados, injeta-se a amostra com padrão interno e, com as áreas obtidas, calcula-se a concentração do componente utilizando a equação:

$$\text{Concentração do componente A} = \frac{\text{Área do componente A} \times \text{Concentração do padrão interno} \times \text{Fator de resposta do componente A}}{\text{Área do padrão interno}}$$

Existem atualmente duas opções para aquisição e processamento de dados que são o integrador e o computador pessoal com software dedicado. Ambos possibilitam executar as mesmas tarefas por parte do usuário, sendo que a diferença básica entre eles é o sistema operacional.

É preciso salientar a importância de poder transferir os dados (cromatogramas) obtidos de uma plataforma para outra, pois para fins de intercâmbio interlaboratorial, isto não pode ser um empecilho para comparação ou análise de resultados.

#### **4.4. Requisitos mínimos de instalação e operação**

---

Para garantir a obtenção de resultados confiáveis e reprodutivos e estar em conformidade com os requerimentos de Qualificação de Instalação (IQ), é necessário que se verifique as condições que se tem no local para executar a instalação. Para isso podemos citar as seguintes condições:

##### **4.4.1. Requisitos da bancada**

A bancada onde será colocado o HPLC deve ser dimensionada de maneira a acomodar bem o equipamento e proporcionar conforto ao usuário que nela trabalha.

As dimensões do HPLC mais o sistema de dados (integrador ou computador), normalmente dois metros lineares são suficientes para acomodar todo o sistema.

Os HPLC's atuais são geralmente modulares, dispostos de maneira que seus módulos fiquem uns em cima dos outros, em formato de torre, portanto, deve-se observar que a bancada não seja demasiadamente alta pois fará com que a torre fique muito alta, causando perigo para o operador principalmente na manipulação de fase móvel.

A estrutura deve ser de forma a suportar em torno de 80 kg, de maneira firme, sem vibrações ou balanços.

Os fabricantes de equipamentos fornecem em seus manuais de pré-instalação as descrições detalhadas da bancada necessária.

##### **4.4.2. Rede elétrica**

A rede elétrica deve ser devidamente aterrada e estabilizada. É recomendado o uso de chave magnética caso haja constantes quedas no fornecimento de energia elétrica.

O número de tomadas deve ser suficiente e no padrão correto para a instalação do sistema. É necessária uma tomada por módulo, além de tomadas para integrador e, no caso de configurações com computador, para a CPU, para o monitor e para a impressora. Para um HPLC tradicional, com bomba, injetor automático, forno, detector e computador de oito tomadas são suficientes. Deve-se deixar uma tomada sobressalente para utilização em assistência técnica e/ou validações.

A figura 7 ilustra o modelo padrão de tomada utilizada em HPLC's.



◀ Padrão de tomadas para o cromatógrafo líquido

### Figura 7. Padrão de tomadas para HPLC

Com relação ao consumo, deve-se obter com o fabricante do respectivo HPLC o consumo de energia por módulo e total, e é dado em Watts ou VA ou KVA. Deve-se consultar um profissional da área elétrica para o dimensionamento e distribuição de capacidade do sistema elétrico.

As oscilações de rede elétrica não são toleradas pelos equipamentos, portanto, é fundamental que se conheça a estabilidade de tensão e que a mesma seja compatível com as especificações necessárias de cada modelo.

#### 4.4.3. Condições ambientais

As condições ambientais basicamente se resumem em temperatura e umidade.

A temperatura da sala onde o HPLC será instalado deve ser controlada sem grandes variações durante o uso. O típico requerido pelos fabricantes é de 25° C, com variação de +/- 2 ° C.

A umidade deve estar abaixo de 95% e não deverá ocorrer condensação.

#### 4.5. Cuidados básicos

---

A manutenção por parte do usuário é de fundamental importância para um bom funcionamento e durabilidade de um cromatógrafo.

Após a utilização do equipamento, deve ser adotado um procedimento de limpeza (que depende do tipo de fase móvel utilizada), e o mesmo vale para a coluna cromatográfica que deve receber atenção especial por se tratar do principal componente do sistema.

Para a limpeza da mesma siga cuidadosamente as instruções contidas no manual.

O sistema que requer um cuidado maior é o que trabalha com solução tampão como fase móvel. Após o uso do mesmo é imprescindível que seja utilizada água (100%) para completa remoção da solução tampão e depois a utilização de uma mistura, por exemplo, metanol (ou acetonitrila) 70% e água 30%. Isto porque, deixando o sistema apenas com água possibilitaria o surgimento de fungos. O usuário deve estar familiarizado com a troca de peças consumíveis de seu sistema. Toda intervenção de manutenção deve estar relatada em um caderno de atividades (logbook).

Aqui estão relatadas as principais partes de consumo para cada módulo:

- Bomba – Selos, pistões, filtros.
- Injetor manual – Selo do rotor, alça de amostra (loop), conexões.
- Injetor automático – Filtros, septos, selo do rotor, partes de unidade de seringa (quando houver), frascos para amostras e reagentes, agulha, alça de amostra.
- Detectores UV-Visível e fluorescência – Lâmpadas, lentes, o-rings.
- Detector eletroquímico – Eletrodos, solução de KCl, o-rings.

O treinamento por parte do usuário, pelo exposto, além da operação do equipamento, deve incluir estes cuidados básicos, sendo obstatante que o profissional tenha formação compatível para este nível de aprendizado.

Consultar os manuais também é uma ótima prática, pois além de informar com mais detalhes o funcionamento do equipamento, serve para esclarecer várias dúvidas que o usuário possa ter. É importante observar os cuidados relativos à segurança quando da manipulação do equipamento. O uso de avental, luvas e óculos de proteção previnem danos de conseqüências graves como a cegueira ou contaminação com amostras, por exemplo, plasma.

A descontaminação do sistema é obrigatória quando houver manutenção, visando sempre a integridade da saúde da pessoa que irá realizá-la.

## 5. SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA ACOPLADOS A DETECTORES DE MASSA

### 5.1. Introdução

A cromatografia é uma técnica fundamental de separação em ciências da vida e áreas correlatas da química. Os detectores tradicionais como ultravioleta-visível, eletroquímico, índice de refração (HPLC) e ionização de chama, condutividade térmica, etc (GC) são amplamente utilizados para quantificação de compostos, pois geram dados em duas dimensões (resposta x tempo).

Os detectores de massas possuem a característica de gerarem dados em três dimensões (resposta x tempo x espécie iônica), ou seja, espectro de massas que podem dar informações importantíssimas quanto ao peso molecular da amostra, sua estrutura molecular, identidade, quantidade e sua pureza. Dados de espectros de massa adicionam especificidade às análises tanto na parte quantitativa quanto qualitativa.

Para a grande maioria dos compostos, os detectores de massas são mais sensíveis e, de longe, mais específicos do que os detectores tradicionais. Podem analisar vários compostos e identificar componentes em cromatogramas não separados, reduzindo assim a necessidade da cromatografia perfeita. Os dados espectrais de massas podem complementar dados de outros tipos de detectores. Enquanto dois compostos podem ter os espectros similares em UV ou em Massas, como no caso de LC-MS, é incomum isto acontecer simultaneamente, portanto, os dois tipos de dados em conjunto podem ser utilizados para identificar, confirmar e quantificar compostos com grande certeza de resultados.

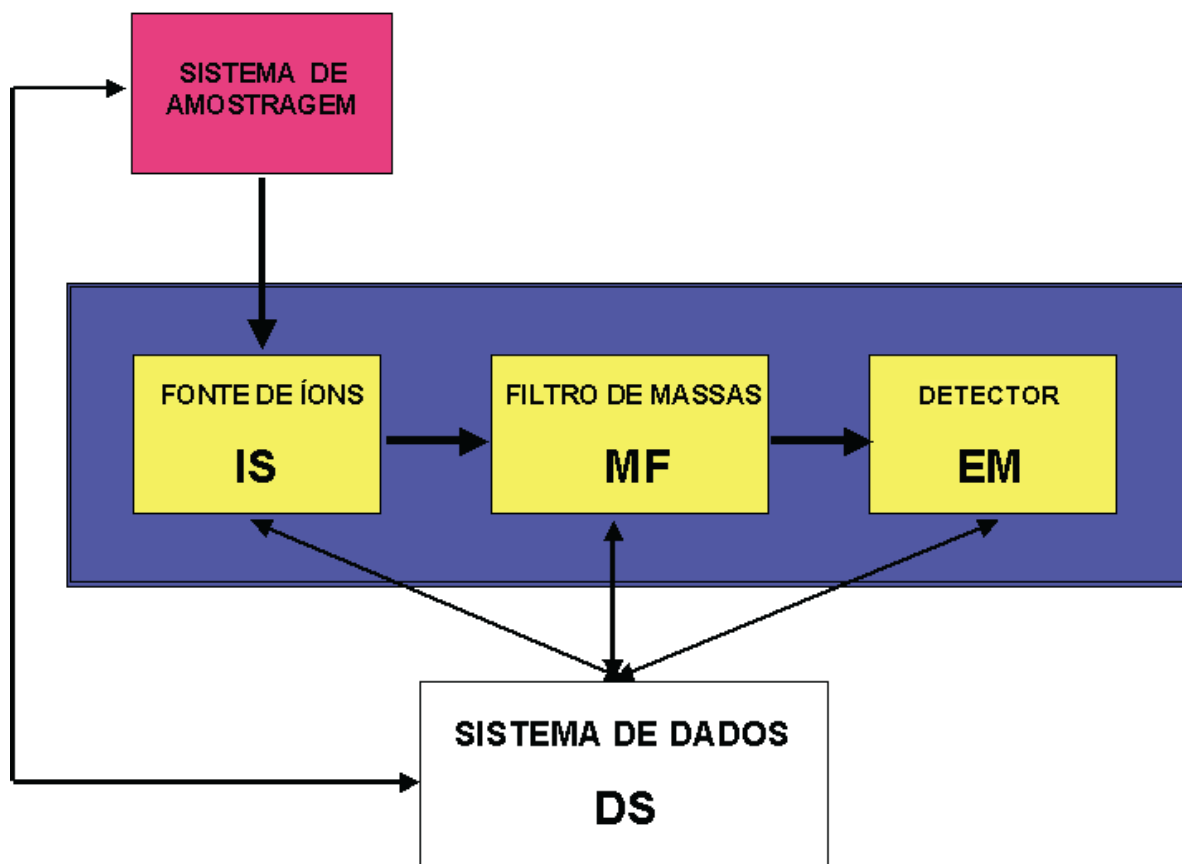
Alguns espectrômetros de massas possuem a característica de executar múltiplos estágios de espectrometria de massas em uma única amostra. Eles podem gerar um espectro de massas, selecionar um íon específico e a partir deste gerar um novo espectro. Alguns têm a capacidade de repetir este ciclo por diversas vezes até que sua estrutura seja determinada (MS/MS ou MS<sup>n</sup>).

### 5.2. Princípio da técnica

O espectrômetro de massas funciona basicamente através da ionização das moléculas e sua fragmentação. Após isto, os íons resultantes são identificados de acordo com sua relação massa/carga. Os três componentes-chave no processo são: a fonte de íons; o analisador e o detector. A fonte de íons tem a função de gerar íons. Há vários tipos de fonte de íons em cromatografia acoplada a detectores de massas. Cada tipo é específico para uma certa classe de compostos. Há também vários tipos de analisadores, responsáveis pela separação dos íons, e detectores responsáveis pela geração de sinais mensuráveis.

Cada um deles possui suas vantagens e desvantagens, dependendo do tipo de informação que se está buscando. Os detalhes dos tipos mais comuns de fontes, analisadores e detectores serão discutidos à seguir:

### 5.3. Descrição básica do sistema



#### 5.3.1. Fonte de ionização

A fonte é onde irá ocorrer a ionização e fragmentação das moléculas. Muitas técnicas de ionização existem, entre várias podemos citar: Bombardeamento de átomos - FAB, Desorsão por Laser - LD, Termospray - TS, Feixe de partículas, etc. Porém, os tipos de fontes mais utilizados são:

##### 5.3.1.1. Impacto de elétrons (EI)

A fonte de Impacto de Elétrons (EI) utiliza um filamento que é responsável pela emissão de elétrons com uma energia definida de 70 eV, como a energia do feixe de elétrons é bem maior que o primeiro potencial de ionização na maioria dos compostos da amostra, esta é ionizada e depois fragmentada. Este tipo de ionização é acoplado à CG.

##### 5.3.1.2. Ionização química (CI)

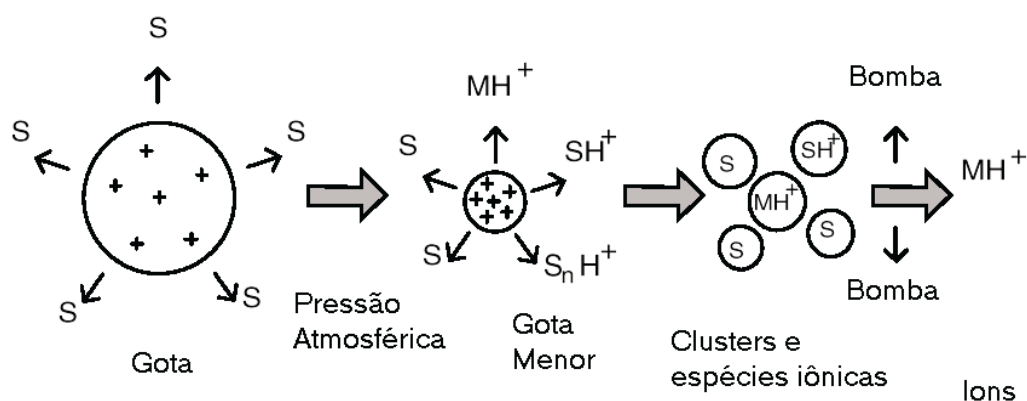
A fonte de Ionização Química (CI) utiliza agentes líquidos ou gasosos para promover uma reação com as moléculas, normalmente a ionização ocorre através da transferência de um próton à molécula, formando espécies denominadas pseudo íon moleculares. Como esta forma de ionizar é bem mais

“suave” do que o impacto de elétrons, o espectro produzido contém poucos fragmentos e quase somente o pseudo-íon molecular, servindo, portanto, para determinação de peso molecular e/ou análises quantitativas. Este tipo de ionização é acoplado à CG.

### 5.3.1.3. Electrospray (ES)

A Ionização por eletrospray teve um grande impacto na utilização da espectrometria de massas em pesquisas biológicas durante os últimos anos. Foi o primeiro método a estender a faixa de massa útil de instrumentos para mais de 50.000 Da. Embora introduzida em sua forma presente em 1984, a técnica volta a investigações da dispersão eletricamente assistida de líquidos no começo deste século. Na realidade, uma descoberta principal aconteceu quase despercebida em 1968, quando Malcolm Dole e colaboradores puderam trazer macromoléculas à fase gasosa em pressão atmosférica. Isto foi possível borrifando uma solução da amostra em um pequeno tubo com um forte campo elétrico na presença de um fluxo de nitrogênio morno para ajudar na desolvatação e medindo, então, os íons formados. Mais adiante, experiências inovadoras neste campo conduziram à introdução da fonte de ionização por ES. Desde então, uma gama extensiva de biomoléculas foi investigada por ES. A amostra normalmente é dissolvida em uma mistura de água e solvente orgânico, comumente metanol, isopropanol ou acetonitrila, podendo ser infundida diretamente, ou injetada em fluxo contínuo, ou seja, contida no eluente de uma coluna de HPLC ou coluna capilar de CE.

A fonte de ES é simples, com a formação de um spray que acontece em um campo de alta voltagem como mostrado na Figura 5. Em um mecanismo proposto, acredita-se que a formação do íon é o resultado de um processo de evaporação de iônica, primeiramente proposto em 1976. Um spray de gotículas é gerado pela dispersão electrostática do líquido lançado pela ponta do capilar. Favorecido por um gás aquecido (normalmente nitrogênio), as gotículas sofrem desagregação, perdendo moléculas de solvente no processo e eventualmente produzindo íons individuais. Em outro mecanismo proposto, a desolvatação das gotículas conduz a uma densidade de carga crescente na superfície da gota que causará uma explosão coulombica que conduz eventualmente à íons individuais.



Seja qual for o mecanismo proposto, os íons são formados à pressão atmosférica e entram em um orifício localizado no vértice de um cone que age como uma primeira barreira para a fase de vácuo. Um coletor (skimmer) recolhe os íons e os guia ao espectrômetro de massas.

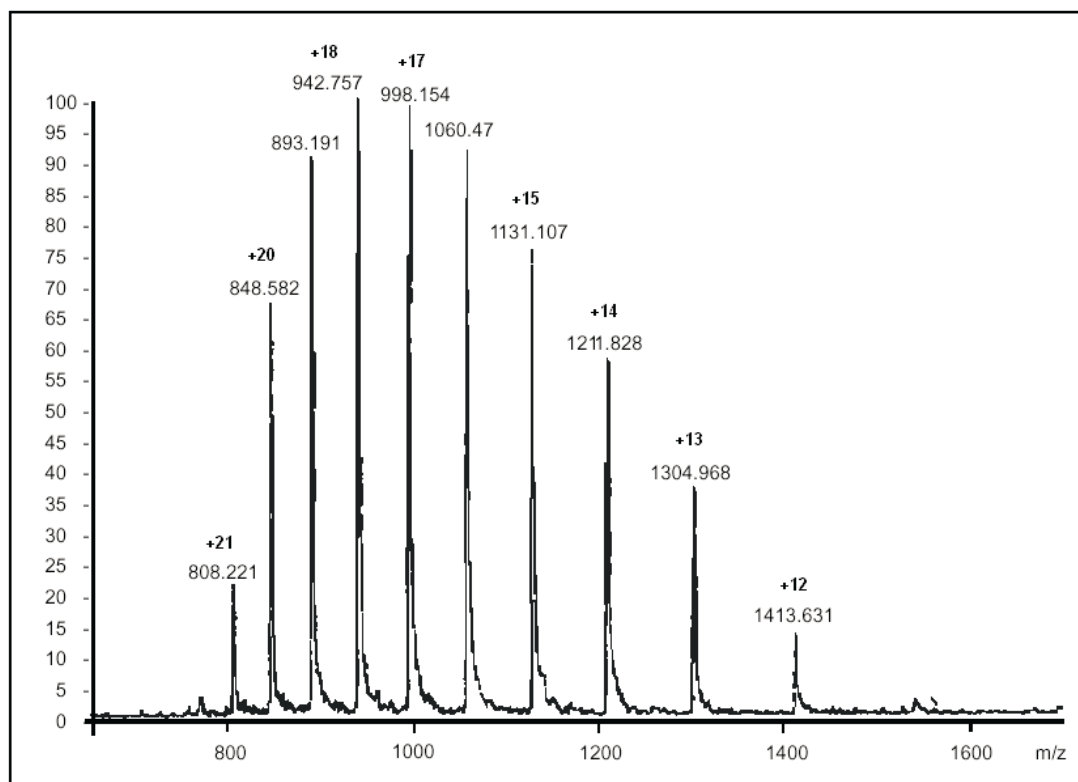
A formação do spray é a parte mais importante da técnica de ES. É normalmente aconselhável filtrar todos os solventes e concentrações altas de eletrólito devem ser evitadas porque estes podem conduzir a supressões na ionização e condições operacionais instáveis. Altos fluxos, compatíveis àqueles utilizados em HPLC, hoje podem ser utilizados através de um gás de nebulização aquecido para ajudar na formação do spray.

Para macromoléculas, cada um dos íons que normalmente entra no espectrômetro de massas tem um alto número de carga. Como os espectrômetros de massas medem as relações massa/carga em lugar de massa, é possível para moléculas de altas massas moleculares terem números suficientes de carga para caírem na faixa de  $m/z$  de um quadrupólo linear, tipicamente  $m/z$  20-4000. Como mostrado na Figura 6A, íons de altas massas moleculares têm freqüentemente uma distribuição larga de estados de carga. A figura mostra o espectro de massas da mioglobina de cavalo (massa molecular: 16951.5) em baixa resolução com cargas observadas de +12 a +21. Esta distribuição de íons permite o cálculo da massa molecular do analito original através de dois íons vicinais com valores  $m/z$   $m_1$  e  $m_2$ , com  $n_1$  e  $n_2$  cargas, respectivamente. Se  $m_1 < m_2$ , e  $n_2 = n_1 - 1$ , então,

$$M = n_1(m_1 - mA) = n_2(m_2 - mA) \quad (1)$$

$$n_2 = (m_1 - mA) / (m_2 - m_1) \quad (2)$$

onde M representa a massa molecular da molécula não carregada e mA a massa do aduto carregado A (por exemplo H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Assim as equações podem ser resolvidas para dar  $n_2$  e M. A medida da distribuição de cargas em macromoléculas nem sempre é fácil ou reprodutível, pois pode sofrer alterações com mudanças relativamente pequenas nas condições de análise, como por exemplo: pH; adição de solventes ou sais; denaturação parcial da proteína; quebra de pontes disulfeto, etc.



A fonte de electrospray é utilizada acoplada a todos os analisadores de massas comuns.

### 5.3.2. Analisadores de massas

Após a entrada das moléculas na fonte de íons e posterior ionização, se faz necessária a determinação das respectivas massas dos íons formados a fim de obter o espectro de massas. A função do analisador de massas é promover a separação dos íons a partir de suas relações massas/carga e transmití-los detector.

Existem diversos tipos de analisadores de massas, sendo os mais comuns e amplamente utilizados os “Quadrupólos” e os “Íon Traps”.

Os analisadores de massas quadrupolares são considerados de varredura, ou seja, a partir da entrada de uma mistura de íons com diferentes relações massa/carga ( $m/z$ ) e diferentes abundâncias, são aplicados campos elétricos fazendo com que em um determinado momento, somente íons de uma massa específica consigam sair ilesos. Variando-se os valores do campo elétrico aplicado se consegue fazer com que íons distintos sejam selecionados e registrados.

Já os analisadores tipo “Ion Trap” não podem ser considerados como instrumentos de varredura puros, pois nestes, os íons são armazenados antes de sua varredura propriamente dita.

#### 5.3.2.1. Analisadores de massas quadrupolar

O instrumento é baseado em quatro barras paralelas numa área quadrangular onde o feixe de íons é focalizado no eixo central destas barras, um potencial elétrico fixo (DC) e um potencial de rádiofreqüência (RF) são aplicados nestas barras diagonais e opostas. Para uma dada combinação de RF e DC, íons de uma específica faixa de massas  $m/z$  têm seu caminho alterado do eixo central. Um espectro de massas é obtido das componentes de tensão DC e RF de maneira sincronizada, ou seja, mantendo a relação RF/DC constante. O potencial  $\phi_0$  aplicado aos pares opostos de barras é determinado por:

$$\pm \phi_0 = U + V \cos \phi t$$

onde U é uma tensão DC e  $V \cos \phi t$ , a tensão dependente do tempo na qual V é a amplitude de RF e  $\phi$ , a freqüência de RF.

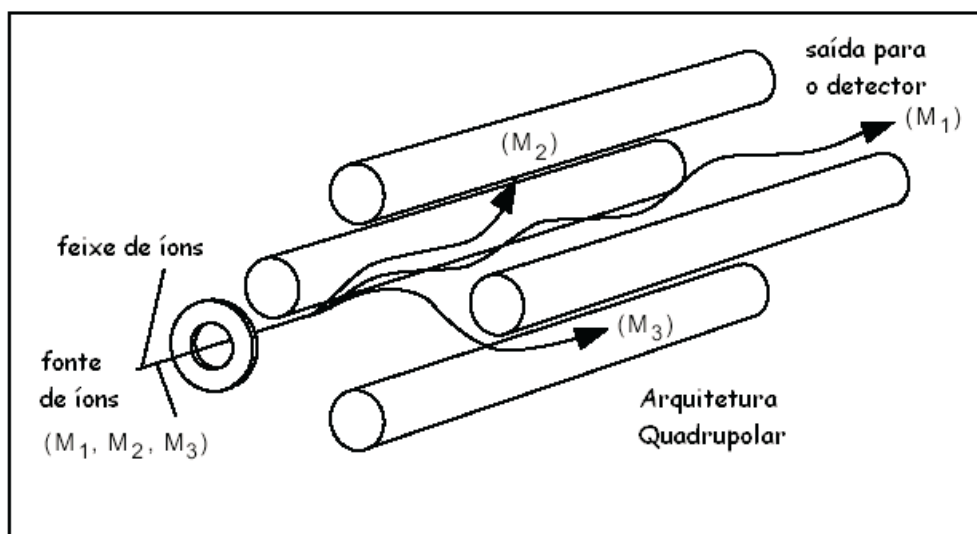


Figura 2. Representação esquemática de um analisador quadrupolar linear



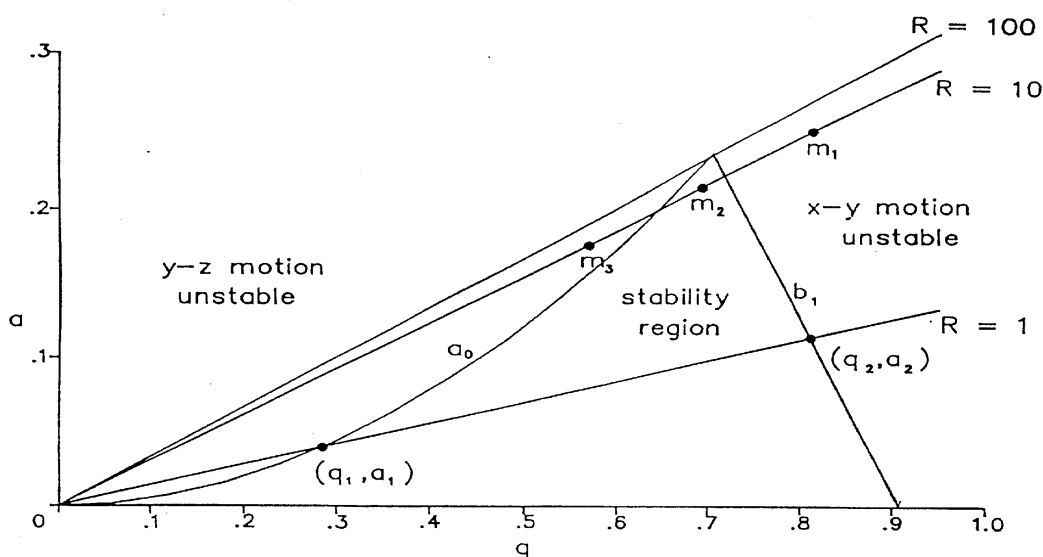
A operação do quadrupólo (bem como do íon trap, como veremos depois) pode ser tratada qualitativamente através do diagrama de estabilidade que correlaciona a amplitude do potencial DC, a amplitude do potencial de RF com a trajetória de um íon estável (ou seja, um íon que consegue passar intacto pelo quadrupólo). Isto está representado nas equações e no gráfico 1.

A equação de movimento para uma partícula carregada pode ser expressa como uma equação de Mathieu na qual pode-se definir os parâmetros  $a_u$ , e  $q_u$ ,

$$a_u = a_x = -a_y = 4zU / m\phi^2 r_o^2$$

$$q_u = q_x = -q_y = 2zV / m\phi^2 r_o^2$$

com  $m/z$  sendo a relação massa/carga do íon, e  $r_o$ , a metade da distância entre as duas barras opostas. Não há nenhum parâmetro de  $z$ , porque o campo de RF só age no plano x/y ( $z$  é o eixo principal do quadrupólo linear).



**Gráfico 1. Diagrama de estabilidade no analisador**

Neste caso, o íon  $m_2$  é o único íon que se mantém estável (note que se encontra dentro da região de estabilidade do gráfico), enquanto que  $m_3$  e  $m_1$  não conseguem atingir o detector. As retas de  $R=100$  e  $R=10$  representam duas combinações distintas da relação DC/RF, através da alteração destas relações se consegue alterar a resolução do filtro de massas, ou seja, a capacidade de diferenciar ou filtrar massas muito próximas umas das outras. Os parâmetros “a” e “q” são respectivamente proporcionais aos valores de DC e RF.

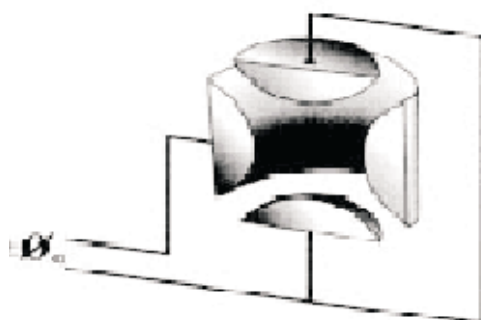
### 5.3.2.2. Analisadores de massas quadrupolar “ion trap”

Este analisador de massa tem os mesmos princípios matemáticos de funcionamento que o quadrupólo convencional, ou seja, estabilidade de íons dentro de uma trajetória específica.

Porém, o grande diferencial é que no íon trap os íons não seguem uma trajetória única em direção ao detector, e sim ficam “aprisionados” em órbitas dentro da estrutura do trap, surgindo assim a razão da denominação “íon trap” (armadilha de íons).

Enquanto que no quadrupólo nós temos a formação dos íons na fonte de íons e posterior expulsão destes íons em direção ao analisador de massas, no trap ocorrem a formação dos íons e análise de massas na mesma região do espaço. Esta região do espaço onde se encontram os íons “aprisionados” corresponde a aproximadamente o volume de um cubo de 1 centímetro de lado.

Na figura abaixo temos a representação esquemática do analisador íon trap.



**Figura 3. Representação esquemática do analisador “íon trap”**

Assim como os quadrupólos, os íon traps também se utilizam de campos elétricos, estes campos elétricos são utilizados, no íon trap, para manter os íons confinados e para a separação das massas (análise de massa).

Neste tipo de analisador de massa, o campo elétrico utilizado é puramente de RF (rádiofrequência consistindo de uma onda senoidal de aprox. 1 Mhz de frequência) que é aplicada diretamente no eletrodo anular central.

Desta maneira, dependendo da amplitude de RF aplicada, se mantêm os íons estáveis dentro do trap ou incrementando-se esta amplitude faremos com que íons de massas maiores sejam “ejetados” da região de confinamento e atinjam desta maneira o detector.

Uma outra peculiaridade dos Ion traps é que se faz necessário um controle sobre o número de íons presentes dentro da estrutura, visando evitar reações destes íons com moléculas ainda presentes. Estas interações podem provocar ligeira modificação no espectro final de alguns compostos, dificultando sua interpretação/ identificação.

Já nos quadrupólos este problema não existe, visto que após sua formação, os íons são quase que imediatamente “jogados” fora da fonte de íons não tendo chance de interagir com moléculas presentes.

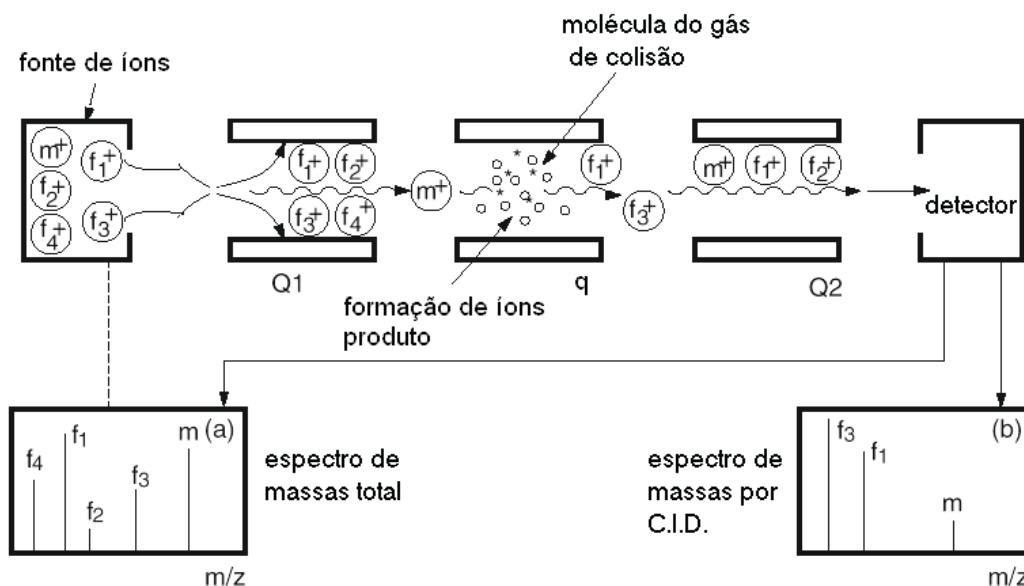
Em contrapartida, a sensibilidade final no modo de varredura completa (full scan) é maior nos traps devido ao fato de que todos os íons formados são necessariamente detectados, pois estes se encontram confinados.

Já nos quadrupólos a situação é distinta, ou seja, enquanto que o quadrupólo está varrendo a faixa de massas visando produzir um espectro, os íons que não se mantêm estáveis são “perdidos” e, portanto, não produzem sinal detectável. É possível, no entanto aumentar significativamente a sensibilidade do quadrupólo fazendo com que este fique sempre fixo em uma massa (ou algumas poucas massas) de interesse sendo esta técnica denominada SIM (Single Ion Monitoring).

### 5.3.2.3. Espectrometria de massas seqüencial (tandem mass spectrometry).

A espectrometria de massas seqüencial (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS ou MS<sup>n</sup> onde n=2, 3...) usa dois ou mais estágios de análise de massa, um para pré-selecionar um íon e o outros para analisar os fragmentos induzidos, por exemplo, por colisão (CID) com um gás inerte, como argônio ou hélio. Esta análise pode ser seqüencial no espaço ou no tempo.

Seqüencial no espaço significa ter vários analisadores de massa em série. Muitas combinações são possíveis, as mais comuns dentre essas são: o triplo quadrupólo (Q1qQ2), os de 4 setores e os instrumentos híbridos. Nesta simbologia, Q representa um quadrupólo filtro de massas e q um quadrupólo de apenas RF (câmara de colisão). No caso do triplo-quadrupólo, um íon de interesse gerado na fonte de ionização é selecionado com o primeiro quadrupólo Q1, dissociado na câmara de colisão q com energias de até 300 eV e os produtos de fragmentação analisados com o segundo quadrupólo Q2.



Deste modo, é possível, por exemplo, obter informações sobre a seqüência de um peptídeo selecionando o íon correspondente ao peptídeo protonado (denominado íon-precursor) e analisando os fragmentos de sua estrutura com Q2. Este processo é chamado de varredura de íons-produto. Muitos outros tipos de varredura ou experiências analíticas podem ser realizadas. Por exemplo, a procura de todos os precursores de um determinado fragmento é denominada varredura de íons-

precursores. Isto é alcançado mantendo-se Q2 estático na razão massa/carga do íon em questão e varrendo todos os íons presentes em Q1, enquanto se realiza dissociações por colisões em q. Em outro modo de varredura, a identificação de íons que apresentam uma perda de um fragmento específico pode ser realizada varrendo-se Q1 e Q2 simultaneamente, mantendo-se a diferença de massa entre os quadrupólos igual à massa do fragmento neutro perdido.

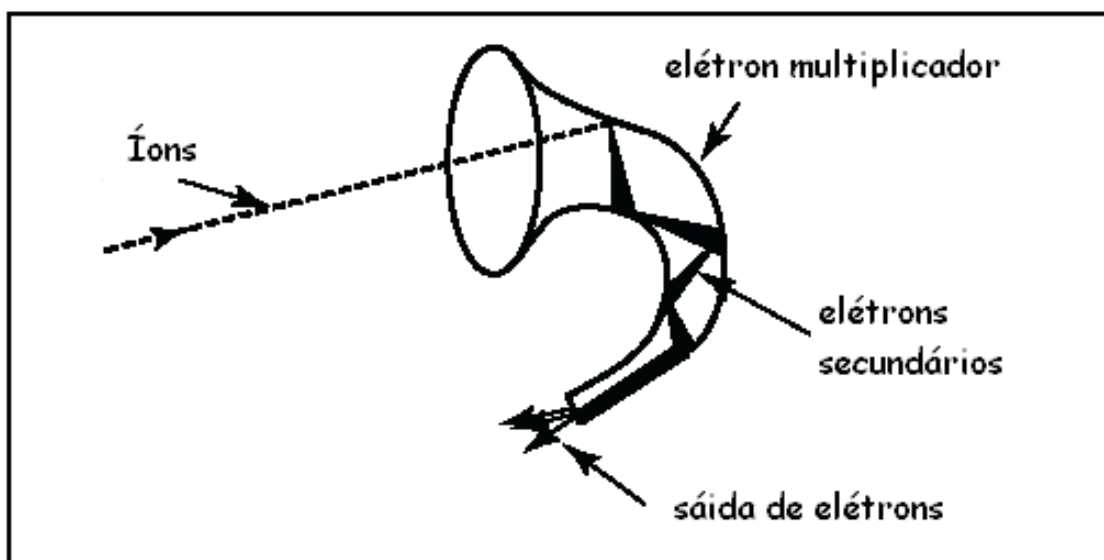
A seqüência no tempo pode ser conseguida através de dispositivos “íon trap” e espectrômetros de massa ICR (também chamados de FTMS). Estes instrumentos não estão de fato limitados a experimentos MS/MS, mas podem atingir múltiplos estágios (MS/MS/MS.../MS, ou MS<sup>n</sup>). Nestes instrumentos, os íons são selecionados através da aplicação de pulsos de tensões específicas e as dissociações ocorrem normalmente por colisões com outros gases.

### 5.3.3. Detectores

Após feita a seleção de íons pelo analisador, estes são direcionados ao detector onde serão transformados em um sinal mensurável. Os detectores podem ser divididos em três grupos. As placas foto-sensíveis e as gaiolas de Faraday encontram-se no primeiro grupo e relacionam o sinal medido diretamente à quantidade do íon analisado. No segundo grupo encontram-se os multiplicadores de elétrons, os foto-multiplicadores e as placas microcanaís que amplificam a intensidade do sinal recebido. Estes são os mais utilizados e serão discutidos aqui. O terceiro grupo é utilizado nos aparelhos de ICR (FTMS) e consistem em um detector de radiofrequência que é aplicado aos íons aprisionados.

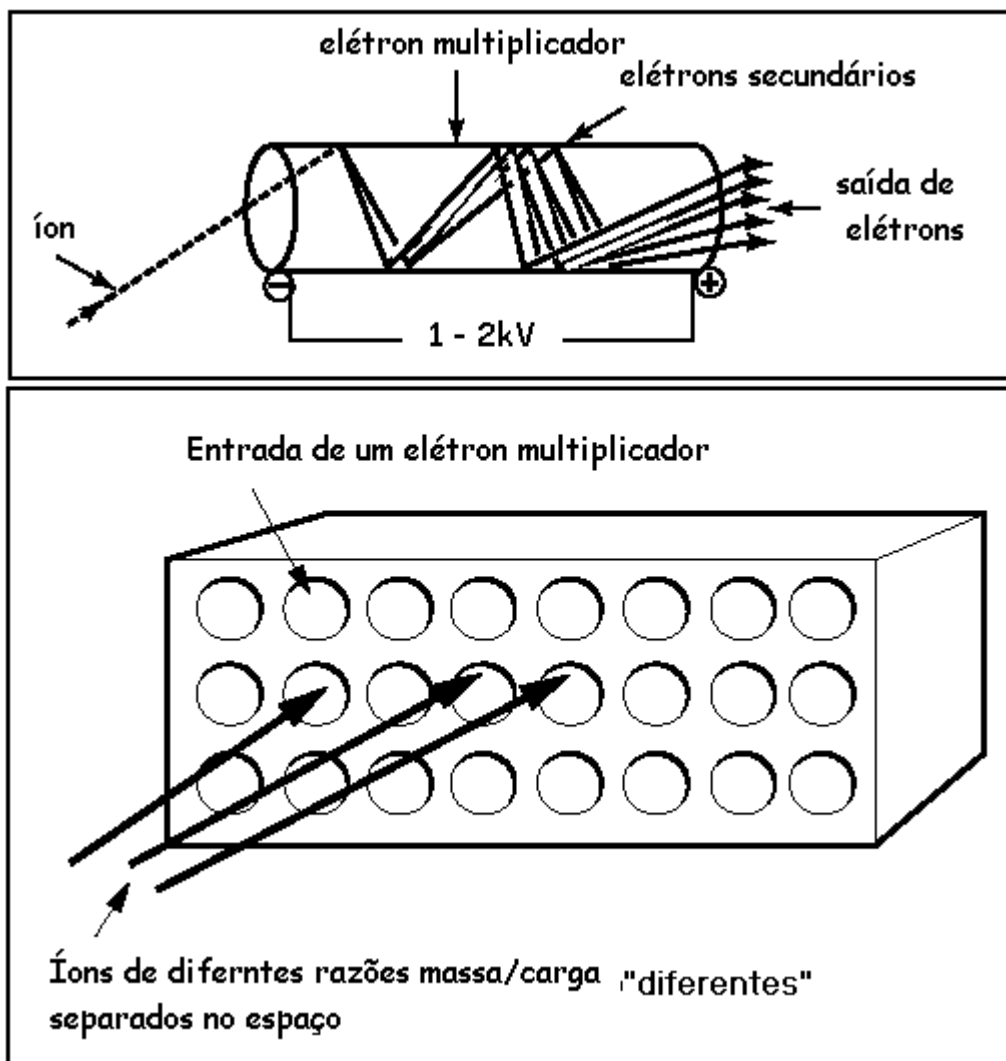
#### 5.3.3.1. Multiplicadores de elétrons

Quando íons positivos ou negativos atingem o dínodo de conversão, no qual é aplicado um potencial negativo, estes causam a emissão de diversos elétrons secundários. Esses elétrons são acelerados para dentro de um multiplicador de elétrons e atingem suas paredes com energia suficiente para arrancar alguns elétrons. Esses elétrons atingirão o outro lado da parede liberando assim, mais elétrons. Este efeito cascata continua até que, finalmente, uma corrente mensurável é criada no final do multiplicador de elétrons.



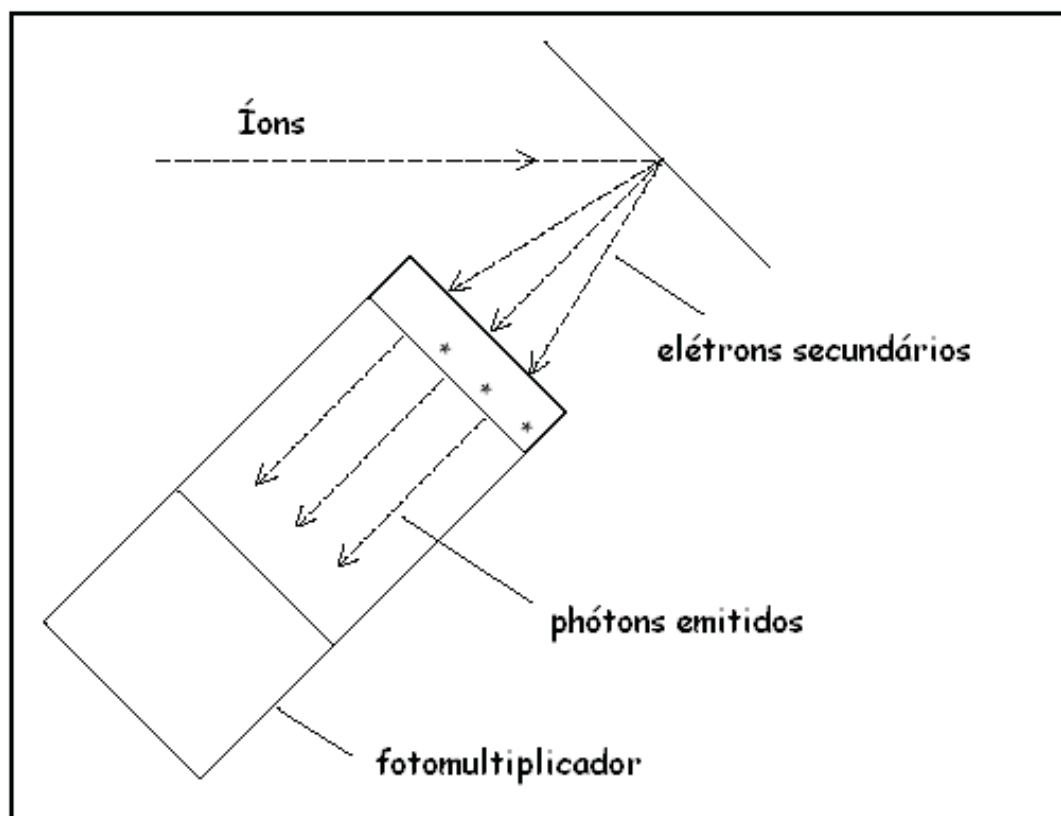
5.3.3.2. Placas microcanais

Placas microcanais consistem em uma placa contendo microcanais cilíndricos paralelos. O lado de entrada destes microcanais é mantido com um potencial negativo de aproximadamente 1kV em relação ao lado de saída. A multiplicação dos elétrons iniciada pela colisão de um íon nesses canais é proporcionada por uma substância semi-condutora que reveste cada canal e gera elétrons secundários. Canais curvos previnem a aceleração de íons positivos em direção ao lado de entrada. O efeito cascata dentro dos canais pode multiplicar o número de elétrons na ordem de  $10^5$  e o uso de várias placas acopladas permite uma amplificação que pode chegar até  $10^8$ . Na saída de cada canal um ânodo de metal coleta a corrente de elétrons e o sinal é transmitido ao processador. Esses detectores microcanais têm também como característica um tempo de multiplicação de sinais extremamente baixo, tornando-os apropriados para a detecção em instrumentos com analisador por tempo de voo.



### 5.3.3.3. Foto-multiplicador

Este tipo de detector é composto por dois dinodos de conversão; uma tela fosforescente e um foto-multiplicador. Este detector, assim como o multiplicador de elétrons e as placas microcanais, permite a detecção de íons positivos e negativos. Na detecção, os íons são acelerados de encontro ao dinodo, que tem uma polaridade inversa a do íon, desta maneira elétrons são então liberados e acelerados em direção à tela fosforescente onde são convertidos em fótons. Os fótons são então detectados pelo fotomultiplicador. A superfície da tela fosforescente é recoberta por uma fina camada de alumínio condutor a fim de evitar a formação de cargas, as quais poderiam prevenir que novos elétrons a atinjam. A amplificação atinge valores de  $10^4$  a  $10^5$ .



### 5.3.4. Aquisição e processamento de dados

A aquisição e processamento de dados são feitos integralmente através de programas computacionais específicos. Estes programas são responsáveis por tarefas que vão desde o controle do tempo em que um íon é monitorado até a construção de curvas-de-calibração onde as áreas (ou alturas) de picos de amostras desconhecidas são intrerpoladas gerando o dado quantitativo requisitado. Cada fabricante possui seu programa de aquisição e tratamento de dados, com recursos e limitações diferentes. Portanto, a compreensão destes programas e posterior criação de procedimentos de operações padrão (POP) são imprescindíveis para condução de qualquer estudo.

Detalhes sobre o processo de quantificação dos compostos podem ser consultados no item 4.6 da técnica de HPLC.

## **5.4. Requisitos mínimos de instalação e operação**

---

O propósito dos requisitos mínimos de instalação é de assegurar que o local de instalação seja devidamente avaliado e preparado com os itens de consumo e suprimentos necessários para uma perfeita instalação.

Os fabricantes fornecerão uma lista de verificação para ser acompanhada antes da data da instalação. Esta lista será específica do instrumento adquirido, porém, em linhas gerais, o que deve ser observado está descrito nos itens seguintes.

### **5.4.1. Requisitos da bancada**

A bancada onde será colocado o LC/MS deve ser dimensionada de maneira a acomodar bem o equipamento e proporcionar conforto ao usuário que nela trabalha.

As dimensões desta bancada devem ser compatíveis com as dimensões do LC/MS mais o sistema de dados (computador e impressora). Normalmente, três metros lineares são suficientes para acomodar todo o sistema.

A estrutura deve ser de forma a suportar o peso do equipamento com segurança, portanto, deve-se considerar uma margem de 20% acima do peso do equipamento, de maneira firme, sem vibrações ou balanços.

Deve-se considerar também espaço livre na parte posterior da bancada (não deve estar encostada na parede) para acomodação de itens necessários ao funcionamento do equipamento, como por exemplo, bombas de vácuo e sistema de refrigeração e circulação de água.

Os fabricantes de equipamentos fornecem em seus manuais de pré-instalação as descrições detalhadas da bancada necessária.

### **5.4.2. Rede elétrica**

A rede elétrica deve ser devidamente aterrada e estabilizada. É recomendado o uso de chave magnética caso haja constantes quedas no fornecimento de energia elétrica.

O número de tomadas deve ser suficiente e no padrão correto para a instalação do sistema. Deve-se considerar, além do módulo de LC/MS, tomadas para o sistema de HPLC e sistema de dados incluindo a impressora.

O padrão de tomada para o LC/MS vai depender da tensão necessária para seu funcionamento. Geralmente estes sistemas, como consomem grandes potências, requerem alimentação de 220 VAC com capacidade para 1,5 a 2 KVA (apenas para o módulo de MS). É importante observar se o equipamento requer 220 VAC em uma única fase (single fase) ou em duas (split fase).

Com relação ao consumo, deve-se obter com o fabricante do respectivo LC/MS o consumo de energia por módulo e total, e é dado em Watts ou VA ou KVA. Deve-se consultar um profissional da área elétrica para o dimensionamento e distribuição de capacidade do sistema elétrico.

As oscilações de rede elétrica não são toleradas pelos equipamentos, portanto, é fundamental que se conheça a estabilidade de tensão e que a mesma seja compatível com as especificações necessárias de cada modelo.

### 5.4.3. Condições ambientais

As condições ambientais para sistemas de LC/MS não se resumem apenas à temperatura e umidade. Estes tipos de equipamentos requerem também alimentação de gás e alguns necessitam de circulação de água refrigerada, além da exaustão.

A temperatura da sala onde o LC/MS será instalado deve ser controlada sem grandes variações durante o uso. O típico requerido pelos fabricantes é de 25° C, com variação de +/- 2 ° C. Um sistema de LC/MS dissipa um calor de 6800 a 8000 BTU's que deve ser levado em conta no dimensionamento do ar condicionado.

A umidade deve estar abaixo de 95% e não deverá ocorrer condensação.

A alimentação de gás (nitrogênio) pode vir de cilindros, compartimentos de nitrogênio líquido ou de geradores de nitrogênio, sendo este último o mais indicado. O consumo típico é da ordem de 15 L/min e a pureza deve ser de 99,5% para cilindros e 98,0% para as outras fontes de nitrogênio. A pressão de trabalho deve ser de 80 a 100 psi.

O local também deve possuir exaustão com capacidade mínima de 15 L/min que deverá ser conectada na saída da bomba de vácuo e da fonte de ionização.

## 5.5. Cuidados básicos

---

A manutenção por parte do usuário é de fundamental importância para um bom funcionamento e durabilidade de qualquer equipamento.

Para um sistema de LC/MS devem ser observados, além dos cuidados básicos para o HPLC já descritos no capítulo 4, alguns itens imprescindíveis descritos a seguir:

### 5.5.1. Sistema de vácuo

Os sistemas de alto vácuo possuem geralmente três bombas sendo uma delas a auxiliar (mecânica) e as outras duas turbo-moleculares.

A bomba mecânica requer a substituição do fluido no mínimo a cada seis meses, independentemente se usada ou não. Algumas também possuem filtros e estes também devem ser substituídos e/ou verificados em intervalos definidos pelo fabricante (tipicamente seis meses).

Já as bombas turbomoleculares (alto-vácuo) são mais específicas e dependem do modelo e das recomendações de cada fabricante. Algumas possuem lubrificação permanente, outras precisam ser lubrificadas em intervalos regulares. Outras ainda requerem que seus rolamentos sejam substituídos em intervalos pré-determinados. Portanto, é fundamental que as instruções de manutenção sejam obtidas com o fornecedor e que o processo seja documentado e acompanhado, pois uma falha nestes sistemas pode comprometer todo o equipamento de forma definitiva.



Leituras de valores de vácuo (pré-vácuo e alto vácuo) devem ser feitas diariamente e seus valores anotados em um “logbook” semanalmente.

### **5.5.2. Fonte de íons**

A fonte de íons é a parte do equipamento mais sujeita à sujeira e contaminações, pois é ela quem recebe a fase móvel com amostra à pressão atmosférica e converte em íons para o sistema de vácuo.

Sua manutenção e limpeza devem ser feitas com base no histórico de uso de cada equipamento e dependerá do tipo, concentração e número de amostras injetadas. De qualquer forma, uma vez estabelecido um intervalo de limpeza, este deve ser observado e documentado.

O usuário deve estar familiarizado com a troca de peças consumíveis de seu sistema. Toda intervenção de manutenção deve estar relatada em um caderno de atividades (logbook).

### **5.5.3. Sistema de nitrogênio**

O sistema de nitrogênio deve ser verificado em intervalos pré-determinados. Normalmente opta-se pelo gerador de nitrogênio pela vantagem na relação custo/benefício e estes dispositivos também possuem filtros, compressores, etc., que também requerem manutenção periódica.

### **5.5.4. Treinamento em cuidados básicos**

O treinamento por parte do usuário, pelo exposto, além da operação do equipamento deve incluir estes cuidados básicos, sendo obstatante que o profissional tenha formação compatível para este nível de aprendizado.

Consultar os manuais também é uma ótima prática, pois além de informar com mais detalhes o funcionamento do equipamento, serve para esclarecer várias dúvidas que o usuário possa ter.

É importante observar os cuidados relativos à segurança quando da manipulação do equipamento. O uso de avental, luvas e óculos de proteção previne danos de conseqüências graves como a cegueira ou contaminação com amostras, por exemplo, plasma.

A descontaminação do sistema é obrigatória quando houver manutenção, visando sempre a integridade da saúde da pessoa que irá realizá-la.

### **5.5.5. Arquivos de sintonia**

Os sistemas de LC/MS possuem programas de sintonia (autotune) que devem ser executados em intervalos regulares. Estes programas geram relatórios que devem ser arquivados para histórico de bom funcionamento e ajuda em intervenções de reparos.

Os cuidados básicos com o equipamento, assim como a verificação de seu desempenho variam muito de um equipamento para outro. Desta maneira, os melhores procedimentos para realização destas tarefas são aqueles sugeridos pelo próprio fabricante. Estes procedimentos devem ser lidos e um procedimento de operação padrão (POP) criado estabelecendo a frequência e o tipo de tarefa a ser realizada. Qualquer não conformidade com este POP deverá ser anotada e justificada.

## 6. VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE INSTRUMENTOS ANALÍTICOS

### 6.1. Introdução

---

Em meados dos anos 90, a verificação de desempenho de instrumentos começa a ter maior importância e o primeiro enfoque foi para sistemas de HPLC, em decorrência de sua larga utilização nas indústrias farmacêuticas; no entanto, hoje esta preocupação se estende a todos os tipos de instrumentos utilizados em um laboratório.

Da mesma forma que em sistemas de gerenciamento de dados, estes trabalhos normalmente são oferecidos pelos fabricantes de instrumentos analíticos, sendo que existem terminologias distintas utilizadas dentre estes, muitas vezes referindo-se aos mesmos serviços prestados. Como exemplo, temos que a Verificação de Desempenho de um instrumento analítico poderá também ser chamada de Qualificação, Qualificação de operação (OQ) ou Recertificação.

No entanto, o que há de mais importante é que qualquer que seja a terminologia utilizada pelos fabricantes, esta deverá corresponder a verificação de desempenho do sistema de instrumentação analítica seguindo um procedimento documentado, de modo a atender as exigências de um sistema de qualidade e de acordo com as GLP (Boas Práticas Laboratoriais), realizado a intervalos de tempo apropriado, definido por cada laboratório em função de sua utilização e ou trabalho empregado.

As empresas de instrumentação recomendam esta verificação em períodos regulares a cada 6 meses ou 1 ano e sempre que o instrumento for submetido a um serviço ou reparo que possa ter influência direta em seu desempenho.

A terminologia Validação existe há muito tempo e apresenta algumas variações de acordo com o país ou empresa. A melhor definição de validação é o conjunto de atividade e/ou informações documentadas que evidenciam um alto grau de segurança que o processo / sistema no qual foi produzido está dentro de especificações pré - determinadas e com os devidos atributos de qualidade. Portanto, validação não é somente um processo de verificação de desempenho, qualificação, qualificação de operação(OQ) ou recertificação, mas sim um processo que deve incluir as seguintes fases:

- Qualificação do Projeto (DQ - Design Qualification);
- Qualificação da Instalação (IQ – Instalation Qualification);
- Qualificação de Operação (OQ – Operation Qualification);
- Qualificação do Desempenho (PQ – Performance Qualification).

### **6.1.1. DQ – Qualificação de projeto**

Na qualificação do projeto do instrumento, deve-se ter acesso a detalhes de desenvolvimento do instrumento, como:

- Utilização de rigorosos métodos de especificação e projeto durante o desenvolvimento do sistema.
- Completa documentação dos procedimentos de garantia de qualidade e controle de qualidade.
- Utilização de pessoal experiente e qualificado.
- Plano compreensível de teste do instrumento.
- Dados de controle, relatórios de erros e procedimentos corretivos aplicados durante desenvolvimento e confecção do sistema.
- Histórico de desenvolvimento do sistema.

Estas informações devem ser fornecidas pelos fabricantes dos instrumentos, porém, com o objetivo de verificação de suas especificações e adequação ao uso proposto.

### **6.1.2. IQ – Qualificação de instalação**

A qualificação de instalação consta da verificação de toda documentação e informações para a instalação do instrumento e software, de acordo com especificações do sistema descritas nos pré-requisitos de instalação e regulamentações locais. O IQ estabelece que o instrumento é recebido assim como foi especificado, adequadamente instalado e em condições de operação. Esta atividade deve incluir:

- Verificação dos itens recebidos de acordo com a documentação adequada.
- Arquivamento de todos os detalhes de descrição e identificação dos componentes do sistema, incluindo diagramas de conexão do instrumento.
- Cópias do certificado de teste do usuário e declaração de conformidade.

A Qualificação de Instalação (IQ) está sendo abordada em cada técnica de instrumentação analítica deste capítulo como Requisitos Mínimos de Instalação.

### **6.1.3. OQ – Qualificação de operação**

A Qualificação de Operação deve estar documentada, verificando que o sistema está de acordo com as especificações operacionais. Um sistema de acompanhamento deve ser utilizado para verificar:

- A realização do treinamento operacional, que deve ocorrer após a instalação e antes do início de operação em rotina do instrumento.
- O comprometimento do usuário em se submeter a todas as etapas solicitadas.
- A realização dos testes de desempenho, de acordo com o fabricante do instrumento, para assegurar que o instrumento esteja em plenas condições de funcionamento.

#### 6.1.4. PQ – Qualificação de desempenho

A PQ consiste na realização de atividades que comprovem que todas as especificações do instrumento estão de acordo com a necessidade para uso. Esta deve ser rigorosa, envolvendo testes necessários para demonstrar a funcionalidade do instrumento e deve conter detalhes como:

- Testes específicos para componentes individuais ou sistema completo.
- Relação de testes.
- Freqüência dos testes.
- Resultados esperados.
- Critério de aceitação.
- Como os testes são documentados.
- Qualificação necessária do operador.
- Ações em caso de falha nos testes.

Para algumas técnicas de instrumentação analítica, existem rotinas definidas em literatura internacionalmente reconhecida como a EP/BP (Farmacopéia Européia), USP (Farmacopéia Americana), dentre outras, que estabelecem parâmetros a serem determinados a fim de validar um sistema analítico que poderão ser utilizados pelo usuário, sendo estes muitas vezes executados por fabricantes de instrumentos analíticos.

Estaremos abordando os procedimentos normalmente utilizados para Verificação de Desempenho das principais técnicas em instrumentação analítica e quando aplicado, suas principais rotinas de Qualificação de Desempenho (PQ) descritas em literatura internacional.

## 6.2. Espectrofotometria de ultra violeta – visível (UV-VIS)

---

Para a Verificação de Desempenho (Qualificação de Operação) de um instrumento analítico, o primeiro passo a ser realizado é uma Manutenção Preventiva, onde tem como objetivo verificar previamente o estado de funcionamento do instrumento, prever e reparar possível problema encontrado.

### 6.2.1. Manutenção preventiva

A manutenção preventiva de um espectrofotômetro de UV-Vis é parte vital para manter a vida útil do instrumento e deve ser realizada em intervalos de 6 meses, onde são realizadas atividades específicas por um especialista. Uma rotina de manutenção preventiva deve incluir:

- Verificação dos itens de segurança do instrumento.  
Inspeção do compartimento de amostras.  
Verificação das tampas e sensores de proteção.
- Verificação do sistema óptico.  
Verificação e limpeza da óptica externa.  
Realização dos testes de desempenho do instrumento: exatidão e precisão de comprimento de onda, correção de linha de base e ruído fotométrico.  
Verificação das condições e alinhamento das lâmpadas.

- Verificação eletrônica.  
Verificação dos diagnósticos internos do instrumento.  
Verificação de fonte de alimentação e rede elétrica.  
Verificação de cabos e conectores.  
Limpeza dos circuitos eletrônicos e verificação de desgaste, corrosão ou defeitos.
- Verificação das partes mecânicas.  
Realização de testes dos motores no interior do instrumento.  
Verificação de funcionamento e comunicação com acessórios.

### 6.2.2. Qualificação de operação (OQ)

A OQ de um espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível consiste na verificação das seguintes partes:

- Exatidão de comprimento de onda;
- Precisão de comprimento de onda;
- Desvio de linha de base;
- Ruído fotométrico.

### 6.2.3. Qualificação de desempenho (PQ)

Estaremos citando abaixo algumas das rotinas descritas para PQ que poderão ser utilizadas em espectrofotômetros de UV-Vis estabelecidas na EP e USP.

#### 6.2.3.1. Farmacopéia européia

Os testes abaixo são relacionados pela Farmacopéia Européia e Britânica (EP/BP) para o processo de validação do instrumento e estão divididos em:

- Exatidão de comprimentos de onda. Testes que possuem o objetivo de verificar a exatidão de posicionamento de comprimento de onda com a finalidade de garantir um baixo desvio de posicionamento do sistema óptico. A EP/BP recomenda a realização de duas rotinas para verificação deste item:  
Método de emissão da linha de deutério, xenônio ou mercúrio.  
Método do perclorato de hólmio.
- Resolução do monocromador. Teste que verifica se o monocromador do instrumento separa a luz do espectro e envia uma pequena quantidade desta luz através do compartimento de amostras. A realização deste teste é feita através do método de Tolueno / Hexano.
- Stray Light (Luz Espúria). A Luz Espúria é definida como sendo a quantidade de luz que chega ao detector quando nenhum comprimento de onda foi selecionado. A luz espúria causa desvios na Lei de Beer-Lambert, reduzindo a linearidade do sistema. Este teste é realizado através da medida de transmitância que estará passando por uma solução e em seguida a mesma leitura é realizada, mas com a fonte desligada. O método utilizado é o do KCl em 200nm.
- Exatidão fotométrica. A exatidão fotométrica é determinada pela medida de valores de absorvância conhecidos e calculando a diferença entre o valor esperado e o valor realmente medido pelo instrumento. O método utilizado é o do Dicromato de Potássio.

### 6.2.3.2. Farmacopéia americana

Os testes abaixo são relacionados pela Farmacopéia Americana (USP) para o processo de validação do instrumento e estão divididos em:

- Controle de comprimentos de onda. Testes que possuem o objetivo de verificar a exatidão de posicionamento de comprimento de onda com a finalidade de garantir um baixo desvio de posicionamento do sistema óptico. A USP recomenda a realização de duas rotinas para verificação deste item:  
Método de emissão da linha de deutério, xenônio ou mercúrio.  
Método do Óxido de hólmio.
- Exatidão Fotométrica. A exatidão fotométrica é determinada pela medida de valores de absorbância conhecidos e calculando a diferença entre o valor esperado e o valor realmente medido pelo instrumento. Os métodos utilizados são:  
Método de Dicromato de Potássio.  
Método através do Filtro NIST.

## 6.3. Cromatografia em fase gasosa – GC

---

### 6.3.1. Manutenção preventiva de GC

Antes de se realizar a Qualificação de Operação ( OQ ) de um GC, é necessário a realização dos procedimentos de Manutenção Preventiva sugeridos pelo fabricante.

Em um Sistema de Cromatografia a Gás, fazem parte da rotina de Manutenção Preventiva:

- Limpeza do Sistema Pneumático e verificação de vazamentos;
- Limpeza dos circuitos eletrônicos e verificação das tensões empregadas;
- Limpeza dos Sistemas de Ventilação e verificação de sua funcionalidade;
- Limpeza do(s) injetor(es) e detector(es), verificação de vazamentos e tensões empregadas;
- Teste de verificação de resposta do(s) detectores.

### 6.3.2. Qualificação de operação

A Qualificação de Operação de um sistema de cromatografia a gás consiste da verificação das seguintes partes:

- Controle de Fluxos do gás de arraste e auxiliares;
- Controle de Temperaturas do Injetor(es), Detector(es) e Forno de Coluna;
- Repetibilidade de sinal do(s) Detector(es);
- Repetibilidade do Amostrador Automático, quando aplicado;
- Cálculos efetuados pelo Sistema de Dados.

#### 6.3.2.1. Controle de fluxos

Esta verificação é efetuada para que possamos obter repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos analisados, repetibilidade no volume de amostra introduzido na coluna cromatográfica,

no caso de injetores do tipo “split” e repetibilidade de resposta do detector. Normalmente, os cromatógrafos poderão estar configurados com controladores eletrônicos de fluxo (EFC) ou com controladores manuais.

Os materiais necessários para sua verificação em ambos os casos são:

- Medidor de Fluxo Digital Calibrado;
- Coluna cromatográfica de referência ou específica para teste.

As verificações dos controles de fluxo deverão incluir não somente o fluxo de gás de arraste que passa pela coluna, mas também incluir os fluxos da purga de septo, da taxa de divisão no caso de um injetor “split/splitless”, fluxo do “make-up” e auxiliares do detector, Hidrogênio e Ar no caso de um detector FID. Estes testes normalmente são efetuados utilizando determinadas condições previamente definidas em procedimentos documentados.

#### 6.3.2.2. Controle de temperaturas

O forno de colunas é a parte de maior importância e influência em uma análise cromatográfica; pequenas variações de temperatura no forno poderão resultar em variações significativas no tempo de retenção e conseqüentemente afetando a repetibilidade analítica.

Os materiais necessários para esta verificação são:

- Medidores de Temperatura Calibrados;
- Coluna cromatográfica de referência ou específica para teste;
- Amostra padrão de referência.

As verificações de temperaturas dos Injetor(es) e Detector(es) são efetuados através das medições em temperaturas operacionais fazendo o uso de medidores de temperatura; sendo que no forno de colunas, além da utilização de medidores de temperatura, são feitos testes de repetibilidade de tempo de retenção em condições e amostra de referência previamente definidos.

#### 6.3.2.3. Precisão de sinal do(s) detector(es)

Esta verificação tem como objetivo avaliar a repetibilidade do detector; no entanto, na maior parte dos procedimentos utilizados, este poderá servir de verificação de repetibilidade do sistema em sua totalidade.

Os materiais necessários para esta verificação são:

- Coluna cromatográfica de referência ou específica para teste;
- Amostra padrão de referência.

Esta verificação normalmente é efetuada em uma determinada condição analítica, realizando injeções consecutivas de uma amostra padrão de referência. O objetivo é efetuar o cálculo de desvio padrão relativo em porcentagem dos valores de áreas desta amostra padrão.

#### 6.3.2.4. Precisão do amostrador automático

As condições para verificação de Amostradores Automáticos são similares à verificação de repetibilidade de sinal de detectores; desta forma, os resultados obtidos em RSD% dos valores de áreas serão duplamente utilizados.

#### 6.3.2.5. Cálculos efetuados pelo sistema de dados

As verificações normalmente efetuadas em Sistemas de Dados referem-se aos cálculos utilizados na estação de trabalho que são:

- Cálculo dos Tempos de Retenção;
- Cálculo das Contagens de Áreas;
- Cálculo de Eventos de Tempo;
- Cálculo dos Coeficientes das Curvas de Calibrações para Padronização Externa e Interna;
- Cálculo das Normalizações de Áreas Corrigidas.

Normalmente estas verificações são efetuadas por arquivos protegidos fornecidos pelo fabricante do sistema de dados; estes arquivos, quando utilizados permitem verificar se os cálculos efetuados estão em conformidade com resultados definidos nestes arquivos referência.

Uma vez concluída a Qualificação de Operação de um sistema de Cromatografia a Gás, todos estes registros deverão ser armazenados em local de fácil acesso.

É habitual que os fabricantes possuam para fornecimento Manuais contendo toda a documentação de conformidade do sistema de cromatografia; incluindo informações para a Qualificação de Projeto e Desenvolvimento do sistema (DQ), a Qualificação de Instalação (IQ) que deve conter as informações em que o sistema foi instalado e a Qualificação de Operação (OQ), incluindo todos os procedimentos a serem realizados e armazenamento dos registros das verificações efetuadas. Portanto, todas as intervenções efetuadas deverão ser evidenciadas neste Manual, servindo este de histórico do sistema.

## 6.4. Cromatografia em fase líquida HPLC

---

### 6.4.1. Manutenção preventiva de HPLC

Antes do início do processo de Qualificação de Operação (OQ) do Sistema de HPLC, é necessário a realização de procedimentos de manutenção preventiva sugeridos pelo fabricante.

Em um Sistema de HPLC, fazem parte da rotina de Manutenção Preventiva:

Parte eletrônica: limpeza das partes eletrônicas e verificação das tensões de alimentação e internas, verificação de funcionalidade das lâmpadas nos detectores e avaliação de sua vida útil.

Parte hidráulica: Limpeza de tubulações e componentes do sistema pneumático, verificação e eliminação de possíveis micro vazamentos e eventual substituição de selos de vedação e filtros de fase móvel e da bomba, verificação de funcionalidade do transdutor de pressão e sistema de amortecimento de pulsos quando aplicável, limpeza e verificação de funcionalidade de sistema de introdução de amostra.



Parte mecânica: Limpeza e lubrificação de componentes mecânicos do sistema de bombeamento a amostrador automático.

#### 6.4.2. Qualificação de operação

O processo de Qualificação de Operação que será aqui demonstrado, está representado esquematicamente na Figura1:

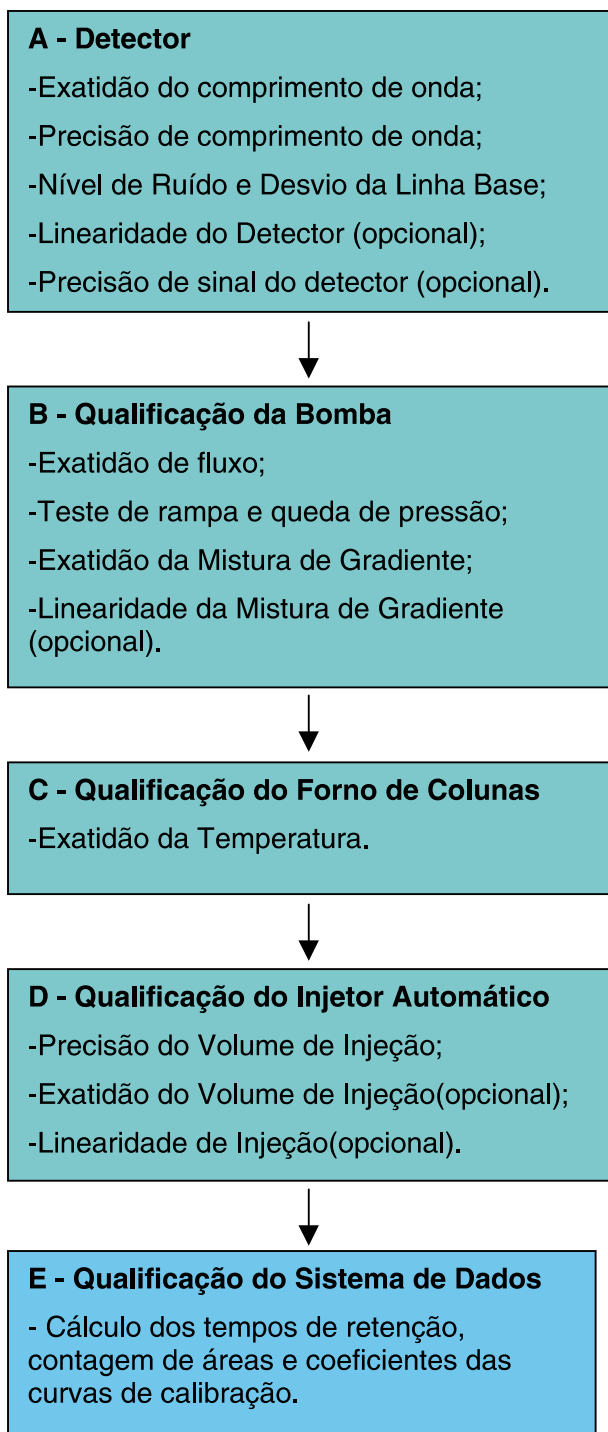


Figura 1. Visualização esquemática do processo de verificação de Desempenho de um Sistema de HPLC.

Como um sistema de HPLC normalmente é constituído por vários módulos, em cada um destes módulos deverá ser realizada a Qualificação de Operação. Assim, a conclusão do processo de Validação ocorrerá com a realização da Qualificação de Desempenho (PQ) que sempre deverá ser realizada utilizando-se todo o sistema de HPLC na realização de atividades que comprovem que todas as especificações do instrumento estão de acordo com a necessidade para uso.

#### 6.4.2.1. Qualificação do detector

Os parâmetros mais importantes que devem ser verificados em um detector de Absorbância são:

- Exatidão do Comprimento de Onda;
- Este teste tem como objetivo de verificar a exatidão na seleção de comprimento de onda com a finalidade de garantir um baixo desvio no posicionamento da grade de difração do sistema óptico;
- Precisão de Comprimento de Onda;
- Poderá ser utilizado o método de emissão da linha de deutério ou xenônio, ambos considerados padrão natural ou utilizando um padrão certificado de uma substância cromófora;
- Nível de Ruído e Desvio da Linha de Base;
- Este teste tem como finalidade garantir a especificação de sensibilidade do detector, uma vez que estes fatores estão diretamente correlacionados a esta medição. Poderá ser utilizado o método de monitoramento e medição de linha de base em intervalos de tempo definidos e verificação com valores padrão.

#### 6.4.2.2. Qualificação da bomba

##### 6.4.2.2.1. Exatidão de fluxo da fase móvel

Este teste tem como objetivo garantir que o fluxo programado é o fluxo real de operação da bomba. Poderá ser determinada pela medida (volumétrica) do fluxo bombeado em um determinado período de tempo

##### 6.4.2.2.2. Teste de rampa e queda de pressão

O Teste de Rampa verifica as válvulas de entrada e saída, vazamento nas conexões e a capacidade da bomba em operar a alta pressão.

##### 6.4.2.2.3. Exatidão da mistura de gradiente

Este teste tem como finalidade verificar a exatidão da composição estática e dinâmica das misturas de fase móvel durante uma análise em sistemas de gradiente.

Poderá ser utilizado o teste de se bombear duas fases móveis em diferentes proporções ao longo do tempo e verificar a real composição estabelecida.

#### 6.4.2.3. Qualificação do forno de colunas

##### 6.4.2.3.1. Exatidão de temperatura do forno

Com o objetivo de verificar a exatidão de temperatura do forno, poderá ser utilizado o método de se programar uma temperatura no forno e efetuar a medição com um termômetro eletrônico calibrado com ponta flexível que se adapte ao compartimento interno do forno.

##### 6.4.2.4. Qualificação do amostrador automático

###### 6.4.2.4.1. Precisão do amostrador automático

Com o objetivo de garantir a precisão especificada do amostrador automático, poderá ser utilizado o teste de injeção de amostras sucessivas de uma solução padrão, obtendo-se o RSD% entre as áreas dos picos, o qual recomenda-se que seja menor que 1%.

##### 6.4.2.5. Sistema de dados

A Qualificação de Sistema de Dados para HPLC deverá ser realizada seguindo os mesmos procedimentos que a do GC.

Uma vez concluída a Qualificação de Operação de um sistema de Cromatografia a Gás, todos estes registros deverão ser armazenados em local de fácil acesso.

### **6.5. Sistemas de cromatografia acoplados a detectores de massas**

---

#### **6.5.1. Manutenção preventiva de sistemas detectores de massas**

Assim como os sistemas anteriores, a manutenção preventiva dos sistemas detectores de massas deve ser executada antes do processo de Qualificação de Operação (OQ).

Cada fabricante fornece uma lista de verificação (“check-list”) do equipamento em questão e esta deve ser solicitada e preenchida a cada intervenção de manutenção preventiva.

Os itens que são verificados em uma manutenção preventiva são basicamente divididos em três módulos:

- Sistema de vácuo;
- Detector de massas;
- Cromatógrafo.

##### 6.5.1.1. Sistemas de vácuo

O sistema de vácuo é fundamental para o bom funcionamento de qualquer sistema de espectrometria de massas e portanto, devem ser executadas manutenções regulares e estas devem ser registradas no histórico de funcionamento do equipamento.

Os itens verificados em um sistema de vácuo são:

- Verificação e substituição dos fluidos lubrificantes das bombas ( auxiliar e alto vácuo);
- Verificação de mangueiras e conexões de vácuo;
- Medição e registro de leituras de alto-vácuo e pré-vácuo de maneira regular.

#### 6.5.1.2. Detector de massas

Os detectores de massas possuem um programa de sintonia ou auto-calibração (autotune) que deve ser utilizado para avaliação do estado de funcionamento do equipamento. Este programa normalmente gera um relatório que deve ser arquivado, pois isto servirá para acompanhar seu desempenho bem como identificar falhas prematuramente como, por exemplo, a necessidade de limpeza da fonte de íons. É recomendável que estes relatórios sejam arquivados com frequência de pelo menos uma vez por semana, com retenção igual ao intervalo de verificação de desempenho.

Os itens observados neste relatório são a exatidão de massas, resolução dos picos e resposta em função da massa.

A limpeza da fonte de íons deverá ser feita sempre que necessária, mas deve ser adotada uma frequência mínima de limpeza que dependerá de como o equipamento está sendo utilizado (tipo de amostra, número de amostras, etc).

#### 6.5.1.3. Cromatógrafo

A manutenção preventiva do cromatógrafo deve ser feita junto com a do detetor de massas e o procedimento já foi descrito nos capítulos respectivos (GC ou HPLC).

### 6.5.2. Qualificação de operação

A Qualificação de Operação é fundamental para garantir que equipamento encontra-se funcionando conforme às especificações do fabricante e, portanto, deve ser realizada em intervalos regulares. Os fabricantes recomendam que esta frequência seja de no mínimo uma vez ao ano ou após uma grande intervenção de reparo. O especialista que executou este tipo de intervenção terá ferramentas para recomendar que seja feita uma Qualificação de Operação após o reparo ou não. Esta avaliação deverá estar documentada.

Os itens avaliados em uma Qualificação de Operação são:

- Precisão do injetor;
- Linearidade do injetor;
- Teste de contaminação de amostra para amostra (carry-over);
- Linearidade do detector (opcional);
- Exatidão de massa;
- Sensibilidade.

#### 6.5.2.1. Precisão do injetor

Este teste é feito executando várias injeções de um padrão conhecido e verificando a reprodutibilidade de área e/ou altura. Toma-se entre seis e dez medidas e calcula-se o desvio padrão relativo, que deverá estar dentro de padrões pré-estabelecidos.

#### 6.5.2.2. Linearidade do injetor

Neste teste são feitas várias injeções de um padrão de concentração conhecido e varia-se o volume injetado. Observa-se então a linearidade em função do volume injetado utilizando uma curva de calibração onde o fator de correlação é utilizado para fazer a avaliação do teste. Compara-se então os resultados com valores pré-estabelecidos de aceitação.

#### 6.5.2.3. Carry-over

O teste de “carry-over” ou contaminação de amostra para amostra é executado injetando um padrão de concentração elevada e em seguida apenas solvente. O resultado ideal é que na injeção de solvente não apareça resíduo do padrão injetado anteriormente. Os limites são estabelecidos normalmente como menor ou igual a uma determinada área ou altura.

#### 6.5.2.4. Linearidade do detector

Um detector de massas torna-se não-linear quando o aumento da concentração de amostra não produz um aumento proporcional na formação e detecção dos íons.

O teste é feito traçando-se diferentes concentrações e plotando-se o resultado em uma curva de calibração onde é avaliado o fator de correlação, comparando-o com resultados pré-determinados de aceitação.

#### 6.5.2.5. Exatidão de massas

A exatidão de massas é avaliada através da injeção de um padrão conhecido, quer seja pelo sistema de auto-calibração, quer seja pelo injetor de amostras.

Os resultados são avaliados comparando-se a massa obtida através do equipamento com o valor teórico do padrão escolhido. Cada fabricante tem seus padrões recomendados e critérios de aceitação para este teste.

#### 6.5.2.6. Sensibilidade

O teste é realizado injetando um padrão conhecido e verificando a relação sinal-ruído do pico especificado no cromatograma obtido. Cada equipamento possui diferente valor para aprovação neste teste.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apostila do Curso de Espectrofotometria de UV-Vis, Varian Brasil (1992).
- Apostila do Curso de Espectrofotometria de UV-Vis, Varian Brasil (1998).
- Apostila do Curso de Treinamento de Espectroscopia, Parte A – Testes de performance, Varian Brasil (1999).
- Manual de Pré-Instalação de Espectrofotômetros UV-Vis, Varian Brasil (1998).
- Instrução de Trabalho – Manutenção Preventiva - Cary 1/100/3/300, ITST 02 AT
- Otto Alcides Ohlweiler - Química Analítica Quantitativa, Livros Técnicos e Científicos Editora, 2ª.Edição, RJ (1980).
- Cienfuegos, F., Vaitsman - , D. Análise Instrumental, Interciência, RJ. (2000).
- Carol II, Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato - Introdução a Métodos Cromatográficos, Editora da UNICAMP, 6ª ed., Campinas- SP (1995).
- Validation Overview , 85-101741-00, Varian (1999) .
- Back to Basics. Micromass UK (1996).
- Varian CP-3800 Gas Chromatograph Regulatory Compliance Documentation, Varian, Walnut Creek. (2000).
- Techniques of Gas Chromatography, Varian, Walnut Creek (1995).
- E. D. Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant - “Mass spectrometry - Principles and Applications” Wiley, New York (1996).
- W. Paul, H. Steinwedel, - “A new mass spectrometer without a magnetic field”, Z. Naturforsch., 8a, 448-450, (1953).
- E. Fischer, - “Three-dimensional stabilization of charge carriers in a quadrupole field”, Z. Phys., 156, 1-26, (1959).
- Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. - *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2.ed., New York, John Wiley and Sons (1979).
- Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L - *Practical HPLC Method Development*. 2.ed. New York, John Wiley and Sons (1997).
- Riley, C.M. - Efficiency, retention, selectivity and resolution in chromatography. In WAINER, I.W.; LOUGH, W.J. eds. *High Performance Liquid Chromatography Fundamental Principles and Practice*. Glasgow, Blackie Academic & Professional. (1995)
- Scott, R.P.W - *Silica Gel and Bonded Phases: Their Production, Properties and Use in LC*. New York, John Wiley and Sons. (1993)
- Grant, D. W. *Capillary Gas Chromatography*. West Sussex. John Wiley & Sons. (1996).
- Scott, R. P. W. *Introduction to Analytical Gas Chromatography*. New York. Marcel Dekker. (1981).
- McNair, H. M., Bonelli, E. J. *Basic Gas Chromatography*. Walnut Creek. Varian. (1969).
- Zweig, G., Sherma, J. *CRC Handbook of Chromatography – Volume II*. Cleveland. (1977).
- Walker, John Q. *Chromatographic Systems* 2nd ed. Academic Press, INC, San Diego, California USA (1977)