



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**NOVA ESTRATÉGIA DE CALIBRAÇÃO EM HPLC-DAD
USANDO MÚLTIPLOS VOLUMES DE INJEÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA APLICADO A ANÁLISE DE
ÉSTERES DO ÁCIDO P-HIDROXIBENZÓICO (PARABENOS)**

EDUARDO AUGUSTO TESCHE

Florianópolis
Dezembro/2022

Eduardo Augusto Tesche

**NOVA ESTRATÉGIA DE CALIBRAÇÃO EM HPLC-DAD
USANDO MÚLTIPLOS VOLUMES DE INJEÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA APLICADO A ANÁLISE DE
ÉSTERES DO ÁCIDO P-HIDROXIBENZÓICO (PARABENOS)**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Orientador: Gustavo Amadeu Micke

Co-orientadora: Camila Pesenato Magrin

Florianópolis
Dezembro/2022



Documento assinado digitalmente

Gustavo Amadeu Micke

Data: 21/12/2022 12:03:59-0300

CPF: ***.843.728-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao professor Gustavo Micke, pelo apoio, dedicação e ensinamentos passados, pela orientação e atenção prestadas no desenvolvimento para os trabalhos de conclusão de curso.

Aos meus pais, Léa Tesche e Geraldo Tesche, e meu irmão Diogo, por seu carinho, apoio e suporte, que sempre me incentivaram a seguir enfrentando os desafios e me mostraram um bom caminho para seguir. Nada do que fiz seria possível sem eles.

Aos meus amigos que fiz ao longo da minha estadia em Floripa, tanto da UFSC quanto de outros lugares. Um abraço especial para meus amigos Ratto, Romain, Vini, Markus, Colaço, Samuel, Breno e Hugo, que passaram horas e horas nos momentos de lazer discutindo sobre química e ciência no geral.

Aos professores, Edson Minatti, Luiz Otávio, Louis Sandjo, Tatiane Maranhão, Daniel Lazaro e tantos outros que foram fundamentais na construção de conhecimento e de visão de mundo que tenho hoje.

A Universidade Federal de Santa Catarina e o Departamento de Química.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1	Química analítica e métodos de análise.....	10
2.2	Validação analítica	12
2.3	Técnicas de calibração	13
2.4	Análise por HPLC	14
2.5	Parabenos	16
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	SEÇÃO EXPERIMENTAL	20
4.1	Reagentes e soluções	20
4.2	Instrumentação e condições cromatográficas	20
4.3	Desenvolvimento do método	20
4.3.1	Otimização dos parâmetros	20
4.3.2	Construção da curva das soluções padrão	21
4.3.3	Construção da curva de calibração por volume variável	21
4.4	Validação do método	21
4.4.1	Parâmetros de mérito	21
4.4.2.1	Linearidade	22
4.4.2.2	Limites de detecção e quantificação	22
4.5	Segurança no laboratório e tratamento de resíduos	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Calibração e quantificação das soluções padrão	24
5.2	Calibração por volume variável	28
5.3	Comparação estatística entre os dois métodos de calibração apresentados	32

6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre diferentes métodos de calibração para construção da curva de calibração	14
Figura 2. Aplicações da cromatografia líquida relacionando peso molecular e polaridade do analito	15
Figura 3. Esquema simplificado de um equipamento HPLC.....	16
Figura 4. Estrutura genérica da molécula de parabeno	17
Figura 5. Cromatograma da solução de parabenos	24
Figura 6. Curvas de calibração da série de parabenos	26
Figura 7. Curva de calibração para o método de calibração por volume variável ...	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de concentração das amostras preparadas e área dos picos cromatográficos obtidos	25
Tabela 2. Valores de coeficiente de determinação e equações de reta provenientes das curvas de calibração	26
Tabela 3. Tabela da análise de variância (ANOVA)	27
Tabela 4. Parâmetros de desempenho analítico do método de calibração por concentração variável	28
Tabela 5. Valores de massa injetada em cada corrida cromatográfica	29
Tabela 6. Dados de volume injetado das amostra e área dos picos cromatográficos obtidos	30
Tabela 7. Valores de coeficiente de determinação e equações de reta provenientes das curvas de calibração	31
Tabela 8. Parâmetros de desempenho analítico de calibração por volume variável	31
Tabela 9. Tabela ANOVA	32
Tabela 10. Tabela do teste t pareado para amostras de propilparabeno	33

RESUMO

O propósito deste estudo foi a utilização da técnica de calibração por volume de injeção para a comparação estatística dos dados entre esta técnica e a técnica de calibração convencional. Foi utilizado um método isocrático em HPLC-DAD para quantificação de uma série de parabenos. A partir da análise de variância das regressões lineares foi possível concluir que essas são significativas e com base no resultado do teste t pareado conclui-se que não há diferença significativa entre os métodos testados.

Palavras-chave: HPLC-DAD, calibração, parabenos.

1 Introdução

A análise de produtos de higiene pessoal perfumaria e cosméticos (HPPC) é um campo amplo estudado na ciência. O tempo e dinheiro investidos para tais análises é de grande relevância uma vez que produtos HPPC fazem parte do consumo básico de um ser humano. O método de calibração escolhido para realizar a análise pode otimizar o tempo da análise bem como torná-la automatizada, mais rápida e menos danosa ao meio ambiente.

Métodos cromatográficos, como Cromatografia Líquida, são largamente utilizados na análise de compostos produzidos pelo homem ou pela natureza. E a demanda por essas análises cresce cada dia mais, uma vez que produtos que são comercializados geralmente possuem faixas de quantidades determinadas para seus constituintes.

A necessidade por resultados analíticos confiáveis, que sejam obtidos por métodos mais simples, baratos e rápidos aumenta cada vez mais. E mesmo com todo o avanço percorrido ao longo dos últimos anos na área de instrumentação analítica e técnicas utilizadas, nem sempre um método é de viável realização em função do custo de operação, da não disponibilidade de uma amostra padrão, pela necessidade de grandes quantidades de reagente, dentre outros fatores. Além do mais, no uso métodos oficiais para quantificação de um analito numa amostra, a etapa de calibração pode levar bastante tempo, além de poder incluir erros que afetarão a medida.

É comum nas análises cromatográficas e em outras análises quantitativas fazer uso de uma curva de calibração, onde são preparadas soluções de diferentes concentrações a partir de uma solução estoque e que serão levadas para análise no equipamento a fim de relacionar os sinais obtidos com a concentração das espécies presentes na amostra. Contudo, um método alternativo pode ser utilizado com a mesma finalidade. Esse método aqui proposto é o método de calibração por volume de injeção, no qual a mudança do sinal lido no equipamento será causado pela diferença no volume injetado pelo equipamento. Como a solução possui uma concentração "x", o volume injetado para análise está diretamente relacionado com o número de mols do analito em questão. Utilizando essa técnica, vários pontos positivos poderiam ser destacados, como a maior automatização da operação, uma vez que a variação de volume seria feita pelo equipamento, no caso de se tratar de

um analito tóxico, haveria uma menor exposição de risco ao analista, diminuição do tempo de análise e também uma abordagem mais verde, já que uma quantidade menor de reagentes seria utilizada.

Visando um menor tempo de análise, uma maior automatização do processo analítico, reduzir o gasto com reagentes e uma maior frequência analítica, é proposto um método cromatográfico em HPLC que faz uso de uma estratégia de calibração por volume de injeção para quantificação de uma série de parabenos partindo de uma solução preparada em laboratório.

2 Revisão da literatura

2.1 Química Analítica e métodos de análise

A Química Analítica é uma ciência que se dedica à medição de quantidades de substâncias químicas presentes em um determinado material ou sistema. É uma área da química que se utiliza de diversas técnicas e instrumentos para determinar com precisão as concentrações de elementos ou compostos químicos em uma amostra. É uma ciência interdisciplinar que é aplicada em muitos campos da ciência, incluindo a química, a biologia, a medicina, a engenharia, a geologia, a meteorologia e a nutrição. Ela é utilizada para fazer análises de qualidade de alimentos, água, ar e solo, para controlar a qualidade de produtos químicos e medicamentos, para fazer análises de meio ambiente, para fazer pesquisas científicas e para muitas outras finalidades. A Química Analítica utiliza uma ampla variedade de técnicas e instrumentos, incluindo espectroscopia, cromatografia, titulação, análise instrumental e técnicas microanalíticas. Cada técnica tem suas próprias vantagens e desvantagens, e é selecionada de acordo com as necessidades da análise e as características da amostra. Em resumo, a Química Analítica é uma ciência importante que fornece informações precisas e confiáveis sobre a composição química de materiais e sistemas, e é aplicável em muitos campos da ciência e da indústria.

As análises realizadas em química analítica podem ser divididas em análises qualitativas e quantitativas. Análise qualitativa é aquela que traz informação sobre a identidade da espécie em uma amostra, podendo indicar se essa espécie está ou não presente na amostra. Já a análise quantitativa visa determinar a quantidade de uma espécie em uma matriz, em termos de quantidade.¹

Os campos de atuação da Química Analítica são muitos, podendo ir desde o estudo da sequência genética do DNA de um animal pelo método de Eletroforese Capilar, como a determinação de metais em água para consumo por Espectrometria, e também a verificação da ocorrência de adulteração em algum produto comercial, tarefa essa que poderia ser realizada por diversas técnicas e equipamentos.

Outra maneira de abordar a Química Analítica para auxiliar na compreensão de como ela se aplica na Ciência é dividi-la nas seguintes categorias: os métodos clássicos e métodos instrumentais. Os métodos clássicos consistem na utilização

de técnicas clássicas para determinação dos analitos como a destilação, precipitação, gravimetria, análise por ponto de fusão e titulação, bem como inúmeras outras técnicas e análises. E por mais que esses métodos tenham sido de suma importância na evolução da Química Analítica, eles vêm sendo cada vez mais substituídos por métodos instrumentais. Os métodos instrumentais contam com uma maior automatização, análises com uma alta precisão e exatidão e muitas vezes de mais simples utilização. Alguns exemplos de métodos instrumentais são: espectrometria de massas, Cromatografia Líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, espectrofotometria, dentre outras.²

Com a evolução da Química e com as crescentes problemáticas ambientais, surgiu um enfoque de tornar a Química Analítica mais ambientalmente amigável. Ou seja, fazer uso de métodos, conceitos e ideias para mitigar os danos causados ao meio ambiente em função do uso de reagentes e solventes que podem poluir e prejudicar a natureza. A origem do termo “Química Analítica Verde” data do ano de 1987 e trata de mudar os paradigmas da Ciência para uma melhor relação com o meio ambiente. A Química Verde pode ser descrita pelo uso de técnicas e metodologias químicas que visam reduzir ou eliminar o uso ou geração de matérias-primas, produtos, subprodutos, solventes e reagentes que são perigosos para o ser humano, saúde ou meio ambiente.³

2.2 Validação analítica

Para utilizar um novo método analítico, este deve passar por uma etapa conhecida como validação. Este processo se dá para confirmar que o método proposto consegue atender as exigências a que ele se propõe, evidenciando isso através de dados objetivos. A validação de um método se dá a partir de qual objetivo se têm ao propô-lo e, a depender desse objetivo, diferentes protocolos devem ser adotados. Por exemplo, se um laboratório de ensaios se propõe a quantificar um analito específico com o uso de um equipamento que pertence ao laboratório, não é necessário que diversas marcas do mesmo equipamento sejam testadas nem que sejam realizados estudos interlaboratoriais, uma vez que a finalidade do método é atender a demanda de análises do próprio laboratório em questão. No processo de validação analítica, informações conhecidas como parâmetros de validação são obtidas. Esses parâmetros dizem respeito à linearidade, sensibilidade, seletividade, limite de quantificação e detecção, robustez, exatidão, precisão, dentre outras informações do método em estudo.^{4,5}

A linearidade de um método analítico é a habilidade do método em fornecer uma relação linear entre o sinal lido em um equipamento e a concentração do analito. Essa linearidade sempre é atribuída a uma determinada faixa de concentração. Graficamente, o resultado é uma equação de reta, da forma $y = ax + b$, conhecida como curva analítica, que expressa a relação entre o eixo x, relativo à concentração de uma espécie, e o eixo y, que representa o sinal obtido experimentalmente. A sensibilidade de um método pode ser interpretada a partir do coeficiente angular da curva analítica, já que com um maior coeficiente angular, uma variação em x será mais acentuada em y.⁶

A seletividade é um parâmetro fundamental para uma análise, uma vez que indica qual a capacidade que o método tem de identificar um único analito na presença de outras espécies na amostra. A precisão verifica a dispersão dos valores de um conjunto de dados obtidos em ensaios analisando uma mesma amostra, uma amostra semelhante ou um padrão analítico. A precisão pode ser avaliada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade e deve expressar a proximidade entre um resultado e uma média das réplicas do experimento. A exatidão avalia a proximidade dos valores obtidos entre o método proposto e pelo valor de referência, sendo expressa em termos de erro absoluto ou relativo. O limite de detecção (LD) demonstra qual a menor concentração de analito na amostra que

o método pode distinguir no ruído do equipamento. O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro que avalia a menor concentração em que o analito pode ser quantificado pelo método proposto.⁶

2.3 Técnicas de calibração

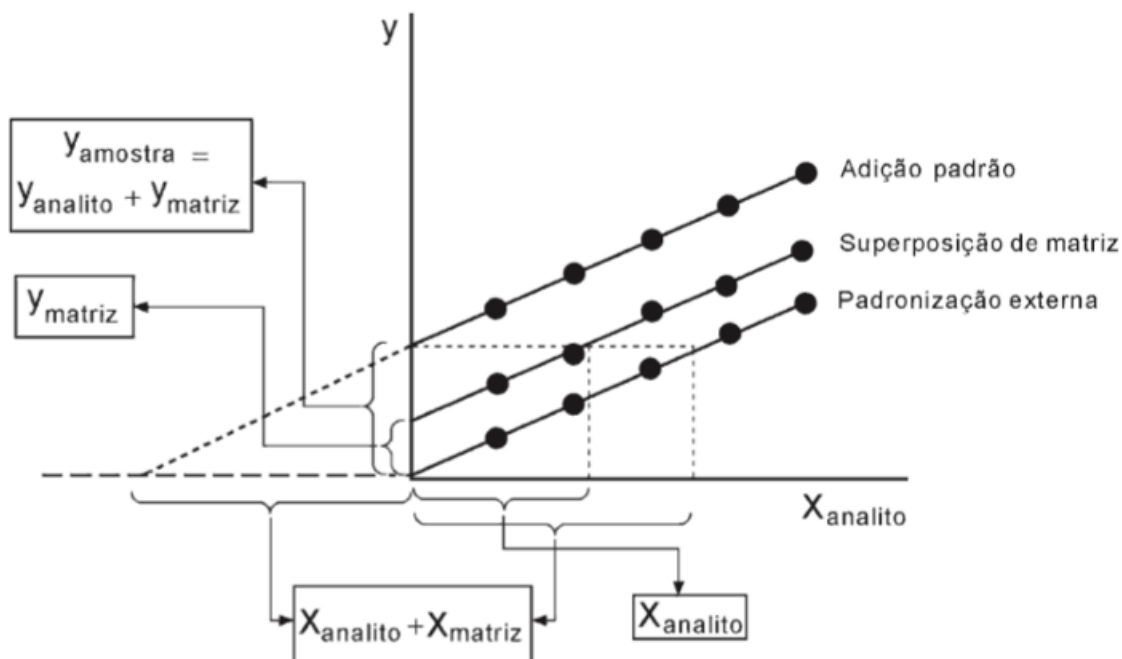
De maneira geral, a calibração é uma operação que busca relacionar duas grandezas, uma de saída e outra de entrada, para um determinado sistema e condições. Na área de química analítica, mais especificamente na parte de quantificação, grandezas de entrada são grandezas que caracterizam os tipos de analitos e suas quantidades. As grandezas de saída são representadas por valores medidos, por meio de sinais obtidos por um equipamento. Essas grandezas são relacionadas através de uma função $y = f(x)$. A função $f(x)$ preferencialmente deve ser uma reta num dado intervalo, sendo esse intervalo conhecido como faixa linear de aplicação. A calibração inclui a seleção do modelo que será utilizado, a estimativa dos parâmetros do modelo e dos erros associados a elas e por fim a validação do modelo.⁷

Para validar um método, a quantificação de um composto pode ser obtida pelo uso das seguintes técnicas de calibração: padronização externa, por adição de padrão ou por superposição de matriz. No método de padronização externa, são comparadas as áreas obtidas nas análises cromatográficas das soluções padrão do analito e a área obtida na análise da amostra. Já o método de adição de padrão consiste no preparo de soluções com determinados volumes da amostra contendo quantidades conhecidas de um padrão analítico. A partir dessas amostras são obtidos os cromatogramas. Com posse dos dados se elabora uma curva de calibração que relaciona a massa da substância adicionada à amostra com as áreas dos picos cromatográficos. A concentração nesse método é obtida pela intersecção da curva de calibração com o eixo x do eixo cartesiano. Esse método é capaz de obter bons resultados no caso do analito estar presente em uma amostra complexa e apresentar interações com a matriz.⁸

Quando há suspeita de interação do analito com a matriz da amostra, pode ser utilizada a estratégia de calibração por superposição de matriz. Nessa técnica a curva de calibração é preparada a partir de uma matriz similar à amostra e isenta dos analitos, e posteriormente adicionando o composto a ser quantificado. O

tratamento dos dados é similar ao método de calibração externa ou por adição de padrão. A Figura 2 relaciona os métodos citados ao perfil gráfico de cada um.

Figura 1. Relação entre diferentes métodos de calibração para construção da curva de calibração
Fonte: Skoog¹



O método de calibração por superposição de matriz é especialmente útil quando a matriz interfere na separação ou detecção do analito.

2.4 Análise por HPLC

High performance liquid chromatography (HPLC) é o método mais utilizado e versátil de cromatografia por eluição. Essa técnica visa separar, quantificar e determinar moléculas em diversas matrizes. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido ou uma mistura de solventes e, em determinado ponto, adiciona-se a essa fase móvel a amostra, para análise dos componentes de interesse.

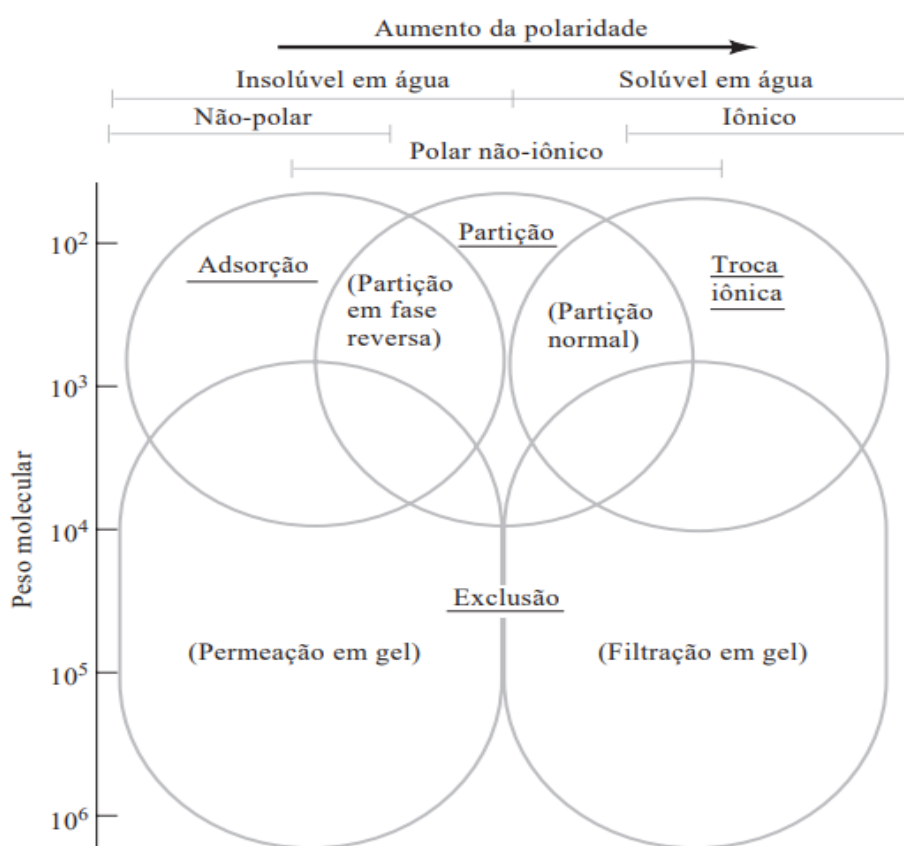
A separação do analito dos outros constituintes da amostra se dá pela diferença de interação que cada um desses constituintes irá apresentar com a fase estacionária, de modo análogo à cromatografia em coluna. Existem diversos

mecanismos de separação dependendo do analito e da fase estacionária, podendo ser citadas as separações por: partição, adsorção, troca iônica, cromatografia por exclusão, por afinidade e para diferenciar compostos quirais.⁹

A Figura 3 ilustra as técnicas envolvidas na análise por HPLC em função da polaridade do analito e também da massa molecular.

Figura 2. Aplicações da cromatografia líquida relacionando peso molecular e polaridade do analito

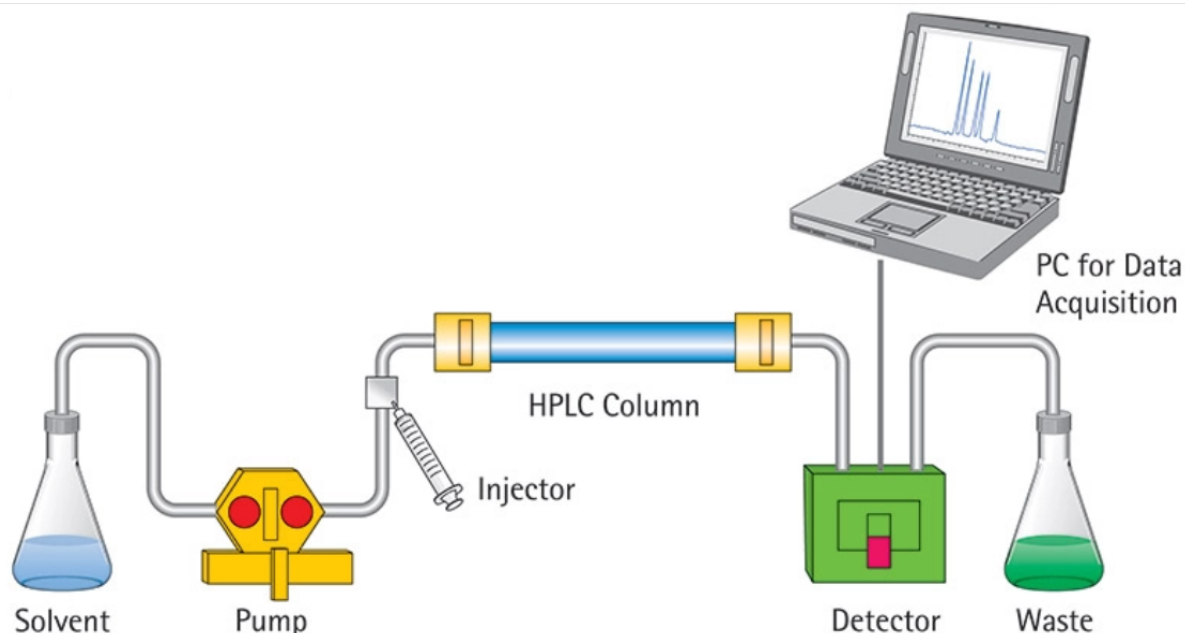
Fonte: Skoog et. al¹



Na Figura 4 é apresentado um esquema de um equipamento de HPLC. O esquema resume o sistema num frasco que contém a fase móvel, uma bomba que empurra a fase móvel para dentro da coluna, um injetor que insere a amostra no sistema, a coluna do HPLC, um detector, um computador para obtenção dos dados e o frasco de descarte.

Figura 3. Esquema simplificado de um equipamento HPLC

Fonte: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>



O sistema é composto por um frasco que contém a fase móvel, uma bomba para deslocar o líquido pelo sistema, um injetor para inserir a amostra na coluna, a coluna cromatográfica (citada anteriormente como fase estacionária), um detector, um computador com um software para análise dos dados e o frasco de descarte dos resíduos. Esse é um esquema simplificado, uma vez que os equipamentos mais atuais contam com diversos módulos e funcionalidades.²

A evolução da instrumentação analítica permitiu que uma enorme variedade de compostos orgânicos fosse quantificada, demonstrando alta sensibilidade e seletividade. Alguns exemplos de compostos quantificados por HPLC são: xantinas extraídas do café, mais especificamente cafeína, teobromina e teofilina; opioides, cocaína e seus metabólitos presentes na urina e também o teor de açúcares e pesticidas em amostra de mel.^{10, 11, 12}

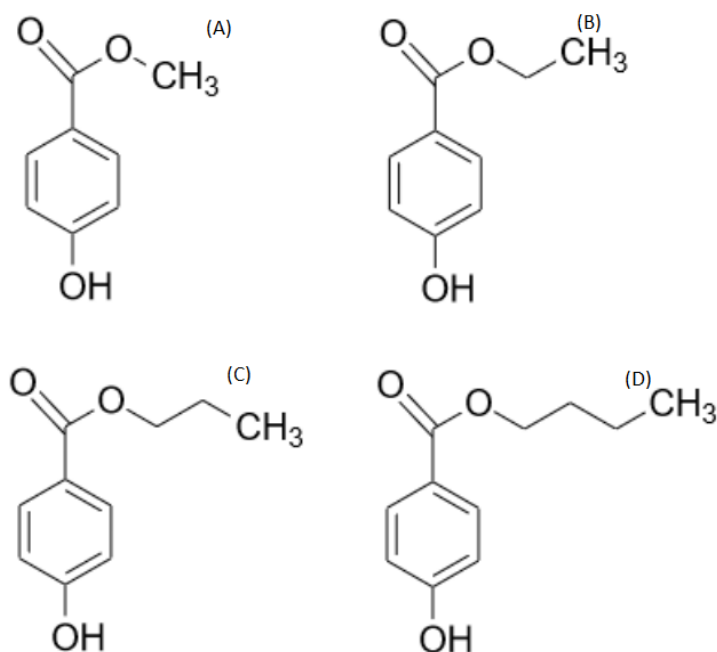
2.5 Parabenos

Produtos farmacêuticos precisam conter em sua formulação compostos que evitem a proliferação de microrganismos para garantir a segurança de quem os

consome. Essa contaminação pode ocorrer no processo de fabricação ou durante o uso após ter sido comprado, e pode ocorrer de diversas formas, como pelo uso da água ou matérias-primas contaminadas, pelos equipamentos e utensílios empregados na preparação do produto, pelo ambiente de produção ou também pela manipulação do consumidor final durante o uso do produto. Um conservante, que age como um bacteriostático, que tem como função inibir a reprodução das bactérias utilizado em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios com propriedades antimicrobianas são os parabenos, compostos que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. O uso destes compostos já data de mais de um século. Os parabenos mais comumente utilizados são metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. São derivados do ácido p-hidroxi benzóico. A estrutura de um parabeno genérico é mostrada na Figura 5.¹³

Figura 4. Estrutura química dos parabenos mais comumente utilizados

Fonte: Nemes, D. et al. (2018) Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms—Assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity.



Os parabenos se destacam como constituintes de produtos comerciais devido a sua estabilidade, funcionalidade numa faixa de pH de 4,5 a 7,5, suportar uma ampla faixa de temperatura, baixa toxicidade e baixo custo de produção. Porém, uma pesquisa publicada em 2004 no Reino Unido encontrou traços de parabenos

em tecido tumoral de mama em 19 de 20 mulheres no estudo. O tipo mais comum de câncer entre as mulheres é o câncer de mama, podendo ser desencadeado por vários fatores como mutações genéticas, terapia de reposição hormonal de longo prazo e hábitos ao longo da vida. A presença de parabenos no tecido tumoral não aponta diretamente que a causa do câncer é a exposição aos parabenos, mesmo assim essa descoberta levou a um estado de alerta e busca por maiores evidências por parte dos órgãos reguladores.¹⁴

Outro fator que gera preocupação quanto aos parabenos é quanto à capacidade de permeação dérmica que este possui, chegando posteriormente à corrente sanguínea. Apesar de chegar ao sangue, depois de absorvidos, os parabenos são hidrolisados por enzimas presentes nos tecidos e no fígado chamadas de esterases, e os produtos da metabolização são conjugados e eliminados pela urina, o que diminui a chance de retenção pelo organismo.¹⁵

3 Objetivos

Objetivo geral - Relacionar estatisticamente parâmetros de desempenho analítico de uma série de parabenos obtidos pelos métodos de calibração por volume de injeção e calibração externa.

Objetivos específicos:

- 1 - Determinar as condições cromatográficas que permitam uma boa resolução e eficiência nos cromatogramas;
- 2 - Obter curvas de calibração para determinação dos parabenos;
- 3 - Realizar uma análise em HPLC utilizando calibração por volume variável;
- 4 - Comparar o método de calibração convencional com o método de calibração por volume variável.

4 Seção Experimental

4.1 Reagentes e soluções

Para o preparo da fase móvel foi utilizado acetonitrila e metanol grau de pureza HPLC ($\geq 99\%$ Tedia, São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.).

A solução padrão de parabeno foi preparada a partir de padrões de uma série de parabenos (cedido por Farma Service Bioextract) dissolvendo 10 mg de cada parabeno em 1 mL de metanol, e essa solução foi avolumada para volume total de 10 mL com água ultrapura. As soluções para a curva de calibração foram obtidas a partir da diluição com água da solução padrão.

4.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Para realização das análises foi utilizado um HPLC obtido da Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador online (G1322A), bomba quaternária (G1311A) que conduziu a fase móvel constituída por 45% de água e 55% de acetonitrila a um vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna Eclipse XDB-C18 (Arlington, TX, EUA) com dimensões de 150 x 4,6 mm; 5 μm , fase estacionária de dimetil 2-octadecilsilano, suportada por sílica. O detector utilizado para análise foi o detector de arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 254 nm.¹⁶ Para obtenção das áreas dos cromatogramas foi utilizado o software *Chemstation* e o programa Excel foi utilizado para tratamento dos dados, confecção de gráficos, tabelas e quantificação das amostras.

4.3 Desenvolvimento do método

4.3.1 Otimização dos parâmetros

Para obter um cromatograma com boa resolução foram realizadas corridas cromatográficas para encontrar qual solvente promoveria a melhor separação dos

picos. Os solventes testados para compor a fase móvel foram acetonitrila, água ultrapura e metanol. Também foram testadas os modos de eluição isocrático e por gradiente. O solvente escolhido após a avaliação dos cromatogramas foi a acetonitrila eluída por método isocrático. Dessa maneira ocorreu a separação adequada dos picos, demonstrando boa resolução e eficiência e também baixo tempo de aquisição dos dados. O parâmetro de fator de retenção para cada corrida foi calculado a partir da Equação 1 mostrada a seguir:

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

O fator de retenção (k) mostra qual a relação entre o tempo de retenção de um analito (t_r) e o tempo de retenção dos compostos que foram pouco retidos na coluna (t_0). Idealmente o fator de retenção deve ter algum valor entre 1 e 10. A razão para tal é que se k é muito baixo, o composto é pouco retido na coluna e com isso pode coeluir com os compostos pouco retidos. Por outro lado, se o k é muito alto, superior a 10, por exemplo, há um risco de o pico cromatográfico alargar e também da análise ser demorada.

4.3.2 Construção da curva de calibração das soluções padrão

A curva de calibração das soluções padrão foi elaborada a partir de diluições da solução descrita no ítem 4.1 visando obter soluções de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L.

4.3.3 Construção da curva de calibração por volume variável

A curva de calibração por volume variável foi elaborada utilizando uma solução de 10 mg/L de cada parabeno e configurando o software do equipamento para dispensar os volumes desejados de 5, 10, 15, 20 e 25 μ L.

4.4 Validação do método

4.4.1 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho analítico avaliados para o método proposto foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão.

4.4.2.1 Linearidade

Para verificar a linearidade dos conjuntos de dados obtidos nos experimentos fez-se o uso de uma ferramenta de regressão linear que forneceu os parâmetros sensibilidade, faixa linear do experimento e a significância da regressão, verificada pelo teste F.

4.4.2.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção representa qual a menor concentração do analito que pode ser detectado pelo método proposto. O limite de quantificação representa a menor concentração em que o analito pode ser quantificado pelo método proposto. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) dos métodos utilizados foram calculados a partir do erro padrão (s), utilizando a Equação 2:

$$LOD = 3s/a ; LOQ = 10s/a ;$$

onde a é o coeficiente angular da reta obtido pela regressão linear.⁶

4.5 Segurança no laboratório e tratamento de resíduos

Visando a realização segura dos experimentos, EPI's como luvas, óculos de proteção, máscara e jaleco foram utilizados durante a realização dos experimentos no laboratório e reagentes voláteis foram manipulados na capela.

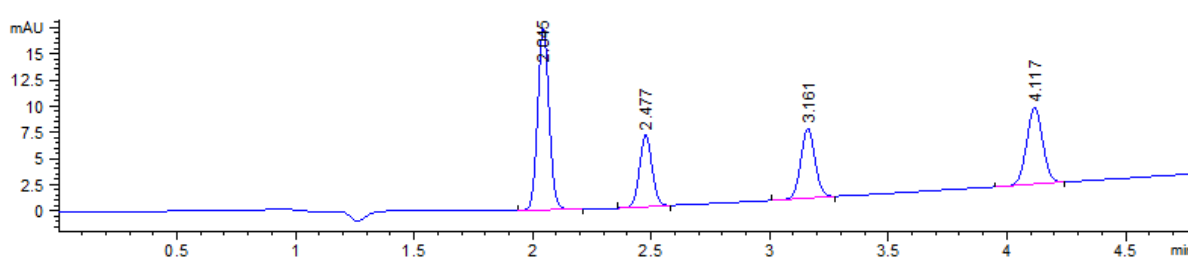
Os resíduos produzidos durante o preparo das soluções e realização dos experimentos foram previamente tratados quando possível e acondicionados em frascos de descarte adequados para serem direcionados ao descarte de resíduos do departamento de Química da UFSC, onde serão coletados pela empresa responsável pelo tratamento e descarte dos resíduos de maneira adequada.

5 Resultados e discussão

5.1 Calibração e quantificação das soluções padrão

Para a obtenção da curva de calibração das soluções de parabenos obtidas através da diluição da solução estoque preparada, foram realizadas corridas cromatográficas em HPLC. Dois modos de eluição foram testados, por gradiente e também o modo isocrático. O modo que apresentou os cromatogramas com o perfil mais adequado foi o modo de eluição isocrática, utilizando uma proporção de fase móvel de 45% do solvente A (água ultrapura) e 55% do solvente B (acetonitrila). O volume de injeção foi de 5 μ L e a vazão 0,5 mL/min. O cromatograma obtido para a solução de 10 mg/L da série de parabenos nas condições citadas acima é mostrado na Figura 6.

Figura 5. Cromatograma da solução de parabenos. Solução de concentração 10 mg/L.



Os quatro picos presentes no cromatograma são referentes aos quatro parabenos presentes na amostra. O primeiro pico é referente ao metilparabeno, e os picos seguintes referentes ao etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. A explicação para isso é que o composto mais apolar, o butilparabeno, é mais retido pela interação com a coluna de fase reversa utilizada.

Os detectores que são usados mais frequentemente em análises de HPLC são os espectrofotométricos (UV/Vis), por sua capacidade de detectar grupos cromóforos de uma molécula. Quando são utilizados múltiplos detectores simultaneamente para medida de absorvância, esses são denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD).¹⁶ Os comprimentos de onda escolhidos para detecção foram de 210 e 254 nm, contudo os cromatogramas que serão apresentados neste trabalho foram obtidos pela detecção em 254 nm, já que os parabenos escolhidos possuem uma absorção significativa por volta desse

comprimento de onda.¹⁷

O tempo total de análise foi de 8 minutos, e o tempo de retenção do pico relativo ao composto que mais foi retido na coluna, o butilparabeno foi de aproximadamente 4,1 minutos.

Foram realizadas análises utilizando os mesmos parâmetros para as 4 outras soluções de diferentes concentrações de parabenos, com valores de 20, 30, 40 e 50 mg/L. Os dados de área do picos cromatográficos foram obtidos por integração automática realizada no software *Chemstation*. Esses dados são mostrados na Tabela 1.

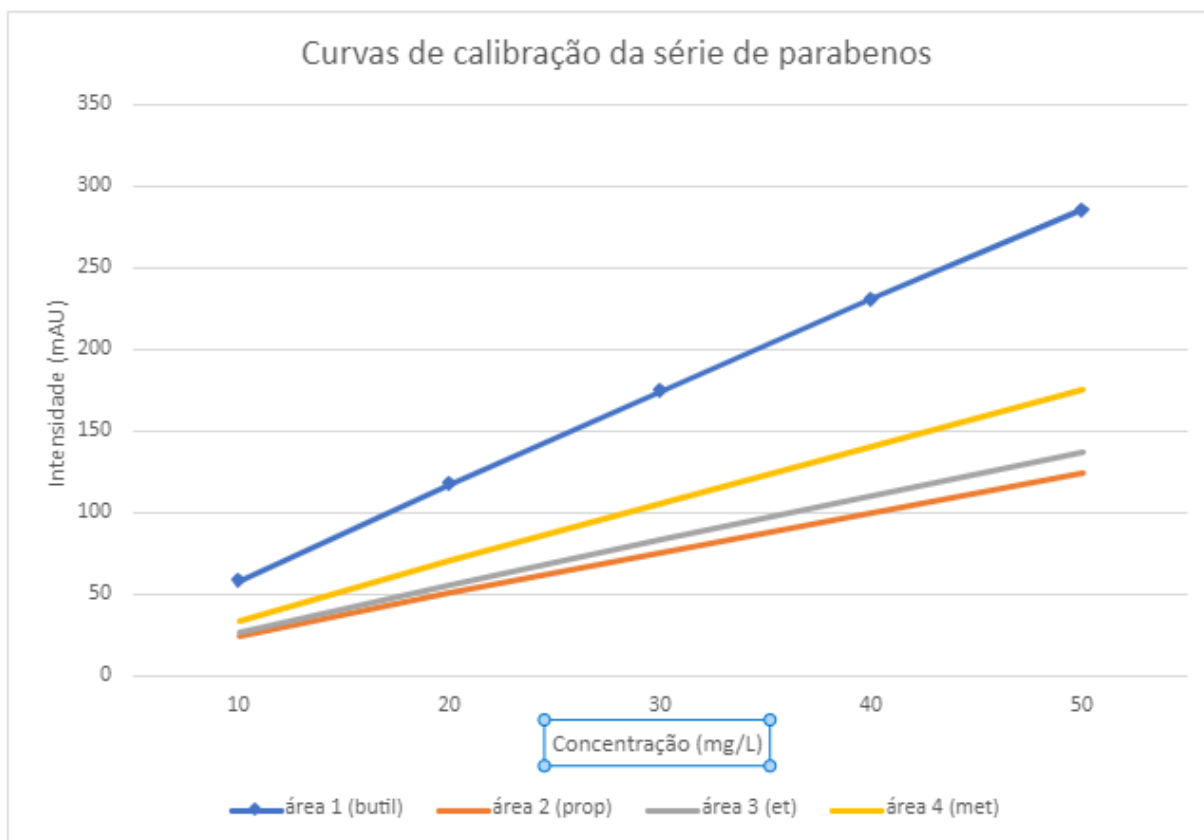
Tabela 1. Dados de concentração das amostras preparadas e área dos picos cromatográficos obtidos
Fonte: Autoria própria

Conc. (mg/L)	Área butilparabeno	Área propilparabeno	Área etilparabeno	Área metilparabeno
10	58,6	25,3	27,6	34,4
20	118,2	51,4	56,4	71,3
30	175,4	76,5	83,7	106,1
40	231,4	100,8	110,4	141,1
50	286,5	125,1	137,1	175,9

Com base nos dados foram construídas as curvas de calibração para obtenção da regressão linear e alguns dos parâmetros de mérito do método. As curvas de calibração geradas a partir dos dados cromatográficos são mostradas na Figura 7.

Figura 6. Curvas de calibração da série de parabenos

Fonte: Autoria própria



As regressões lineares para as 4 curvas de calibração foram feitas no software Excel e as equações de reta e o parâmetro R^2 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de coeficiente de determinação e equações de reta provenientes das curvas de calibração

Fonte: Autoria própria

Parabeno	Butil	Propil	Etil	Metil
Equação de reta	$y = 5,69x + 3,32$	$y = 2,49x + 1,12$	$y = 2,73x + 1,14$	$y = 2,73x + 1,14$
R^2	0,9998	0,9998	0,9997	0,9999

Quando R^2 , conhecido como coeficiente de determinação, apresenta um valor maior do que 0,999, é considerado que há um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Esse valor superior a 0,999 foi obtido em todas as curvas, demonstrando

que esse método se enquadra na faixa de aplicação linear.¹⁸

Outra tabela obtida através do tratamento dos dados foi a tabela de análise de variância ou tabela ANOVA. Essa análise é um teste de hipótese que indica se há ou não relação entre os valores de x e y para um determinado nível de significância. As duas hipóteses que o teste avalia são: existe relação linear entre os valores x e y, ou, não existe relação linear entre os valores x e y. A Tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros da análise de variância.

Tabela 3. Tabela da análise de variância (ANOVA)

Fonte: autoria própria

Butil	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	32376,1	32376,1	12666,71	1,54651E-06
Resíduo	3	7,668	2,556		
Total	4	32383,77			
Propil					
Regressão	1	6200,1	6200,1	12500,20	1,5775E-06
Resíduo	3	1,488	0,496		
Total	4	6201,58			
Etil					
Regressão	1	7452,9	7452,9	11943,75	1,689E-06
Resíduo	3	1,872	0,624		
Total	4	7454,72			
Metil					
Regressão	1	12446,7	12446,7	23221,61	6,231E-07
Resíduo	3	1,608	0,536		
Total	4	12448,39			

Os parâmetros indicados na primeira linha da tabela 3 são: graus de liberdade, soma quadrática (SQ), média quadrática (MQ) (ou variância), é uma soma de quadrados dividido pelo grau de liberdade, o valor F é igual ao quadrado médio

da regressão dividido pelo quadrado médio do resíduo e o F de significação é um parâmetro para comparação com a significância do método. Quando F de significação é menor do que o nível de significância escolhido, que no caso é 0,05, é recusada a hipótese da não relação linear entre os dados. Assim sendo, todas as regressões foram significativas.¹⁹

Em cada conjunto de dados foi feita a análise do erro padrão para calcular os limites de quantificação e detecção. O valor utilizado como base no cálculo é o erro padrão, que expressa a magnitude média do erro na correlação das variáveis x e y. Utilizando a expressão para cálculo desses parâmetros explicitada no item 4.4.2.2, os valores obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de desempenho analítico do método de calibração por concentração variável
Fonte: autoria própria

	Butil	Propil	Etil	Metil
Erro padrão	1,598	0,7042	0,7899	0,7321
Slope	5,96	2,49	2,73	3,53
LOD	0,804	0,848	0,868	0,622
LOQ	2,68	2,82	2,89	2,07

Os valores de LOD e LOQ obtidos demonstram que a faixa de concentração escolhida para o trabalho é adequada, uma vez que a solução de menor concentração é de 10 ppm.

5.2 Calibração por volume variável

A proposta do método de calibração por volume variável usa como base a hipótese de relacionar a área do pico com a massa injetada. Para os métodos de calibração utilizados, foram utilizadas amostras que pudessem ser comparadas a partir da massa injetada. A Tabela 5. expressa os valores de massa para cada método, no qual m_1 é a massa injetada no método de calibração das soluções com diferentes concentrações e m_2 a massa injetada para o método de calibração por volume variável.

Tabela 5. Valores de massa injetada em cada corrida cromatográfica

Fonte: Autoria própria

Concentração (ppm)	10	20	30	40	50
Volume (µL)	5	5	5	5	5
m ₁ (10 ⁻⁷ g)	50	100	150	200	250
Concentração (ppm)	10	10	10	10	10
Volume (µL)	5	10	15	20	25
m ₂ (10 ⁻⁷ g)	50	100	150	200	250

Segundo Locatelli *et al.*¹⁹, a área do pico cromatográfico pode ser relacionada com fatores conhecidos numa corrida cromatográfica conforme mostrado na Equação 3:

$$\text{Área} = (\varepsilon \cdot 0,06 \cdot b \cdot m) / F \cdot M \quad ;$$

na qual ε é o coeficiente de absorção molar, b é o caminho ótico, m é a massa, F é o fluxo do equipamento e M é a massa molar do analito.

Como o fluxo, o coeficiente de absorção molar e o caminho ótico são constantes no experimento realizado, é possível relacionar a área do pico com o número de mols injetado, uma vez que a expressão mostrada acima possui o fator m/M_w que é equivalente a n , o número de mols.

Foi realizado o mesmo tratamento estatístico aplicado ao item 5.1. Os dados construção das curvas de calibração por volume variável para a série de parabenos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Dados de volume injetado das amostra e área dos picos cromatográficos obtidos

Fonte: autoria própria

Volume (μL)	Área butilparabeno	Área propilparabeno	Área etilparabeno	Área metilparabeno
5	58,4	25,2	27,8	34,3
10	116	50,9	55,7	69,1
15	173,9	76,1	82,6	103,0
20	231,6	101,1	109,9	137,1
25	289,2	127,8	137,3	170,2

Com base nos dados da tabela acima foram plotadas as curvas de calibração, mostradas na Figura 8.

Figura 7 Curva de calibração para o método de calibração por volume variável

Fonte: autoria própria

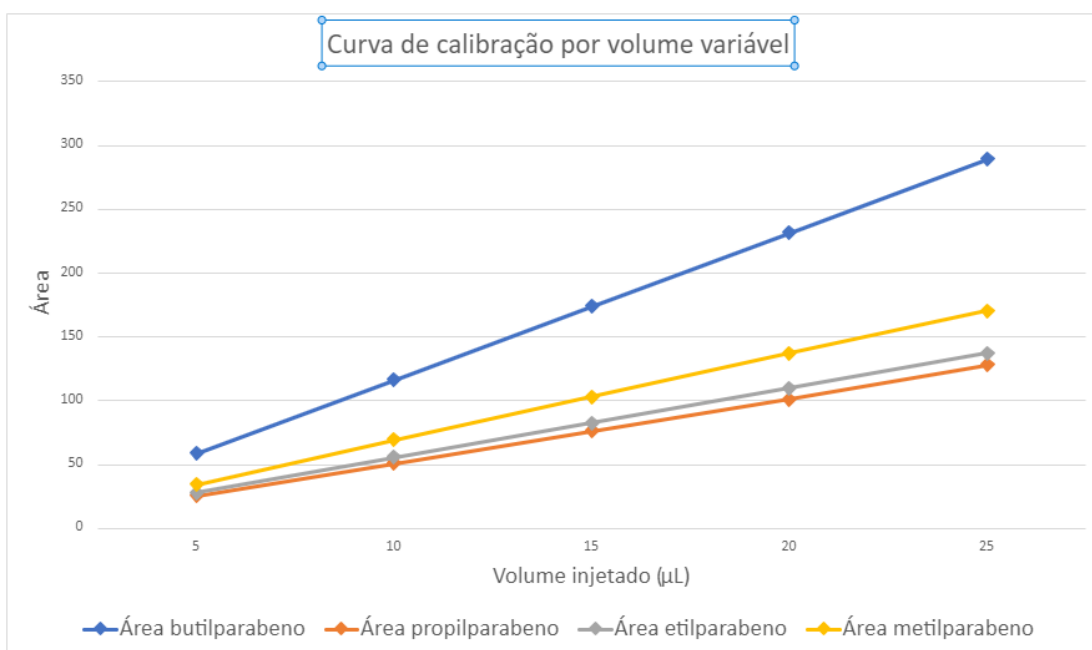


Tabela 7. Valores de coeficiente de determinação e equações de reta provenientes das curvas de calibração

Fonte: autoria própria

Parabeno	Butil	Propil	Etil	Metil
Equação de reta	$y = 5,77x + 0,66$	$y = 2,55x - 0,4$	$y = 2,73x + 0,7$	$y = 3,34x + 0,8$
R ²	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999

De maneira análoga à explicação feita no item 5.1, como o valor de R² é superior a 0,999, o ajuste linear é ideal para o conjunto de dados. Os parâmetros LOD e LOQ foram calculados para esse conjunto de dados, e os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros de desempenho analítico do método de calibração por volume variável

Fonte: autoria própria

	Butil	Propil	Etil	Metil
Erro padrão	0,08944	0,5006	0,2503	0,5189
Slope	11,5	5,10	5,46	6,79
LOD (mg/L)	0,0233	0,294	0,137	0,229
LOQ (mg/L)	0,0777	0,981	0,458	0,764

Os valores de LOD e LOQ para o método utilizando volume de injeção variável são inferiores aos valores obtidos pelo método convencional. Isso ilustra o fato de que a automatização na injeção dos volumes e também a não necessidade das diluições da solução estoque feitas por um analista aumentam a precisão da técnica.

A tabela ANOVA para a série de parabenos é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Tabela ANOVA

Fonte: autoria própria

Butil	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	33315,98	33315,98	4166498	2,59E-10
Resíduo	3	0,024	0,008		
Total	4	33316,01			
Propil					
Regressão	1	6522,91	6522,91	26022,27	5,25E-07
Resíduo	3	0,752	0,250		
Total	4	6523,66			
Etil					
Regressão	1	7463,82	7463,82	119103,57	5,36E-08
Resíduo	3	0,188	0,0626		
Total	4	7464,01			
Metil					
Regressão	1	11546,4	11546,4	42870,31	2,48E-07
Resíduo	3	0,808	0,269		
Total	4	11547,21			

De maneira análoga ao método de calibração convencional, os dados da Tabela 9 demonstram que as regressões são significativas.

5.3 Comparação estatística entre os dois métodos de calibração apresentados

O teste t pareado é um teste realizado para a comparação entre um método recomendado e um novo método que está sendo proposto. O teste baseia-se nos valores médios obtidos nos conjuntos de dados de cada método. Se o valor calculado de t for menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$, é considerado que não há diferença significativa entre os valores obtidos pelos dois métodos.²⁰

Para comparação dos valores obtidos para os dados do propilparabeno pelos dois métodos de calibração foi aplicado o teste t de *Student* para 95% de confiança nos conjuntos de dados dos métodos A e B, respectivamente calibração por concentração variável e calibração por volume variável.

Tabela 10. Tabela do teste t pareado para amostras de propilparabeno

Fonte: autoria própria

Parâmetros	Método A	Método B
Média	88,45	88,97
Variância	1003,75	1089,95
Observações	4	4
Stat t	-0,703	
t _{crítico} bi-caudal	3,18	

Com base na Tabela 10, observa-se que o valor calculado de t(Stat t) de -0,70 é menor que o valor t_{crítico} bi-caudal, levando a conclusão que não há diferença significativa entre os valores obtidos pelos dois métodos.

6 Conclusão

O método de calibração por volume variável desenvolvido no presente trabalho obteve dados que demonstraram forte correlação com o método de calibração convencional. Dados estatísticos comprovaram a significância das curvas de calibração de cada método bem como a equivalência estatística entre esses. Os experimentos realizados não sofreram efeito de matriz, uma vez que a amostra foi preparada com padrão analítico em metanol e água. Sendo assim, é interessante efetuar mais análises para elucidação de quais sistemas são apropriados para o uso do método proposto. Destaques positivos para o método sugerido são que há uma maior automatização do processo, diminuição da possibilidade de erros causados por um analista, menor gasto do padrão analítico e solventes, e menor exposição do analista no caso do uso de padrões tóxicos. Pontos negativos que podem ser destacados é a necessidade de uma calibração rigorosa do injetor, uma vez que uma pequena variação no volume injetado pode comprometer a exatidão dos resultados da análise. Outro ponto é que toda a análise depende de apenas uma solução, dessa maneira se houver algum erro no preparo dessa solução, todos os resultados serão afetados

7 Referências

- 1 - Skoog, D. A. et al. Principles of Instrumental Analysis. 2007. Sexta edição. Cengage Learning.
- 2 - Harris, D. C. Análise química quantitativa. 2010. Oitava edição. Editora GEN
- 3 - Anastas, P. T. Green analytical chemistry. 1999. Crit. Rev. Anal. Chem. 29, 167
- 4 - INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 - Revisão 09. 2020
- 5 - ANVISA. Farmacopeia Brasileira. v. 1. 6. ed. Brasília/DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019
- 6 - Ribani, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. 2004. Química Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780
- 7 - Barros Neto, B. de, Pimentel, M. F., & Araújo. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). 2002. Química Nova, 25(5), 856–865
- 8 - Debatin, V. Novas estratégias de quantificação e padronização interna utilizando injeções múltiplas em LC-ESI-MS/MS. 2016. Tese de mestrado
- 9 - Touchstone, J. C.. History of Chromatography. 1993. Journal of Liquid Chromatography, 16(8), 164
- 10 - Huck, C. W., Guggenbichler, W., & Bonn, G. K. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. 2005. Analytica Chimica Acta, 538(1-2), 195–203.
- 11 - Fernández, P., Vázquez, C., Morales, L., & Bermejo, A. M. . Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). 2005. Journal of Applied Toxicology, 25(3), 200–204.
- 12 - Alghamdi, B. A., Alshumrani, E. S., Saeed, M. S. B., Rawas, G. M., Alharthi, N. T., Baeshen, M. N. Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC–MS techniques in honey samples collected from Saudi Arabian markets. 2020. Saudi Journal of Biological Sciences.
- 13 - Oliveira, M. A.; Lima, E. M. Identificação e Quantificação de Parabenos em Matérias-Primas Farmacêuticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 2006. Anais eletrônicos do III Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação UFG

- 14 - Jabou J. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: Adverse Effects of Bisphenol A and Parabens to Women's Health. 2016.
- 15 - Hoppe, A. C. et. al. Avaliação da toxicidade de parabenos em cosméticos. 2017. Revinter, v. 10, n. 03, p. 49-70.
- 16 - Carvalho, F. G. B. Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade para determinação de bromoprida na presença de parabenos por CLAE-DAD e estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. 2022. Tese de doutorado.
- 17 - Kumar, S., Mathkar, S., Romero, C., & Rustum, A. M. Development and Validation of a Single RP-HPLC Assay Method for Analysis of Bulk Raw Material Batches of Four Parabens that are Widely Used as Preservatives in Pharmaceutical and Cosmetic Products. 2011. Journal of Chromatographic Science, 49(5), 405–411.
- 18 - Canhanga, P. E. Modelo matemático para previsão de vendas: Regressão Linear Simples. 2020. Cadernos Do IME - Série Matemática, (14), 71–81.
- 19 - Locatelli, M. et al. Use of HPLC in the Determination of the Molar Absorptivity of 40 -Geranyloxyferulic Acid and Boropinic Acid. 2011. Chromatographia 73:889–896
- 20 - Nascimento, R. F, Comparação dos método oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos em bebidas alcoólicas. 1998. Food Sci. Technol 18 (3).