



**UnB**

Instituto de Química  
Programa De Pós-Graduação Em Química

TESE DE DOUTORADO

UM NOVO MÉTODO ALTERNATIVO PARA ANÁLISES QUANTITATIVAS POR  
CROMATOGRAFIA PLANAR USANDO DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS

TAYNARA REZENDE MACHADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF

2019



**UnB**

Instituto de Química  
Programa De Pós-Graduação Em Química

TESE DE DOUTORADO

UM NOVO MÉTODO ALTERNATIVO PARA ANÁLISES QUANTITATIVAS POR  
CROMATOGRAFIA PLANAR USANDO DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS

Tese apresentada ao programa de Pós-  
Graduação em Química como pré-  
requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Química

TAYNARA REZENDE MACHADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF

2019

## Dedicatória

É necessário sempre acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite e você, truta, é imbatível [...].

Racionais MC's

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde, sabedoria e calma para conduzir esse trabalho. Agradeço-o também por ter colocado tantas pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus pais, William e Misna, meu irmão Daniel, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Em especial agradeço ao meu esposo, Elvis, pela dedicação, persistência, serenidade e equilíbrio nas horas em que mais precisei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Fonseca por se disponibilizar a me orientar, contribuindo com seu conhecimento para o meu aprendizado. Pelos puxões de orelha e abraços nas horas necessárias e também por ter me incentivado a crescer como profissional e, principalmente, como ser humano.

Aos professores Dr. Ângelo Lira e Wender que me acompanharam desde a minha entrada na UnB, atentos ao meu desenvolvimento. Agradeço por sempre se preocuparem comigo, se disponibilizarem a me ajudar incondicionalmente, e por me fazer sorrir em momentos que chorar parecia ser a única opção.

Em especial agradeço ao professor Dr. Leonardo G. Paterno por ter me levantado em um dos momentos mais difíceis em minha vida. Por me orientar, aconselhar, e principalmente, por não me deixar abandonar meu trabalho e minha vida. Terei uma dívida de gratidão eterna com você meu amigo!

E mesmo que eu gaste um bilhão de palavras, ainda assim não conseguirei agradecer completamente as minhas amigas, Aricelli, Júlia, Kelen, Mylen, Fernanda Ferrari, Maria Fernanda pelo carinho, cuidado, preocupação e companheirismo.

Aos colegas do LIAMA (Lilian, Fabiana, Camila, prof. Jez, prof. Ana Cristi, Lucas, Gerson...) pela amizade, companheirismo, apoio e disponibilidade recebidos durante esses 3 anos.

À UnB, aos técnicos, estagiários, professores do Instituto de Química por todo apoio concedido. Aos alunos de Iniciação Científica, Elisa Santos e Jorge Pires, que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPDF pelo auxílio financeiro.

Aos professores por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

## Índice de Títulos e Subtítulos

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos .....	xiv
Capítulo 1.....	1
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Geral.....	6
2.2 Específicos .....	6
Capítulo 2.....	7
3. BREVE HISTÓRICO DA CROMATOLOGRAFIA.....	8
4. CROMATOLOGRAFIA PLANAR.....	10
4.1 Cromatografia em Papel (CP).....	10
4.2 Cromatografia em Camada Delgada.....	15
5. ANÁLISES QUÍMICAS POR IMAGENS DIGITAIS .....	24
5.1 Propriedades das imagens digitais .....	25
5.2 Dispositivos de capturas de imagem.....	26
5.3 Modelo de cor RGB .....	28
5.4 Uso de detecção com imagens digitais em Cromatografia Planar .....	30
Capítulo 3.....	34
6. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS POR CROMATOLOGRAFIA EM PAPEL COM DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS .....	35
7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
7.1 Papel cromatográfico empregado .....	35
7.2 Procedimentos para as corridas cromatográficas.....	36
7.3 Construção do ambiente de iluminação controlada .....	39
7.4 Programa de análise .....	40

7.5	Construção de um sistema de detecção por Reflectância na região do visível .....	43
7.6	Reagente e soluções .....	47
7.6.1	Soluções dos íons metálicos .....	47
7.6.2	Solução eluente .....	47
7.6.3	Solução reveladora .....	47
7.6.4	Preparo da amostra .....	47
7.6.5	Preparação dos padrões usados na espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).....	48
8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
8.1	Estudos preliminares com solução mista contendo quatro íons metálicos.....	49
8.2	Determinação de Cu <sup>2+</sup> e Ni <sup>2+</sup> em ligas com detecção por imagens digitais.....	50
8.3	Determinação dos íons de interesse em amostras .....	56
8.4	Determinação de Ni <sup>2+</sup> e Cu <sup>2+</sup> em ligas metálicas por reflectância na região do visível.....	58
9.	CONCLUSÃO .....	61
	Capítulo 4.....	62
10.	UM NOVO MÉTODO ALTERNATIVO PARA A ANÁLISE QUANTITATIVA POR MEIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA UTILIZANDO UM DISPOSITIVO MULTICANAIS E CROMATOGRAMAS COM BASE EM IMAGENS DIGITAIS .....	63
11.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	63
11.1	Desenvolvimento das placas cromatográficas .....	63
11.2	Procedimento para a realização das corridas cromatográficas .....	64
11.3	Construção do ambiente de iluminação controlada .....	65
11.4	Programa desenvolvido para realização das análises com imagens digitais.....	67

11.5	Medidas de reflectância .....	67
11.6	HPLC .....	67
11.7	Microscopia Confocal.....	68
11.8	Reagentes e soluções .....	68
11.8.1	Soluções estoques.....	68
11.8.2	Soluções Padrão .....	69
11.8.3	Solução Eluente.....	69
11.8.4	Preparo de Amostra.....	69
12.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
12.1	Avaliação e caracterização dos dispositivos desenvolvidos para CCD	70
12.2	Avaliação do sistema de detecção baseado em imagens digitais na determinação de dois analitos .....	73
12.3	Determinação de CAF e ACM em medicamentos.....	75
12.4	Avaliação do sistema de detecção baseado em imagens digitais na determinação de três analitos .....	76
12.5	Determinação de CAF, ACM e AAS em medicamentos.....	80
12.6	Estudos Comparativos .....	82
13.	CONCLUSÃO .....	87
Capítulo 5.....		88
14.	ESTUDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE LEVAMISOL EM AMOSTRAS DE COCAÍNA POR CCD E DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS: UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A CONFECÇÃO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO IMPRESSÃO EM 3D .....	89
15.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	89
15.1	Estudos para separação de cocaína e levamisol por CCD .....	90
16.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
16.1	Avaliação preliminar dos suportes para CCD fabricados em impressora 3D.....	91

16.2	Estudos para separação de cocaína e levamisol por CCD .....	92
17.	CONCLUSÃO .....	100
	Referências Bibliográficas .....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (a) Estrutura de repetição da celulose formada por duas moléculas de D-glicose e (b) Esquema ilustrativo das interações intra e intermoleculares na celulose.....	11
<b>Figura 2.</b> Esquema das forças envolvidas no fluxo capilar em fibras de papel. $P_{atm}$ : pressão atmosférica, $P_c$ : pressão devido a forças capilares, $Q$ : fluxo de fluido, $\Delta P$ : queda de pressão. Adaptada da ref. <sup>30</sup> .....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo do desenvolvimento cromatográfico em CP .....	12
<b>Figura 4.</b> Estrutura da sílica gel com a representação da superfície, destacados os grupos: silanol vicinal (Si — OH) em (1), silanol geminal (HO — Si — OH) em (2) e siloxano (Si — O — Si) em (3). Os grupos siloxanos também estão presentes no interior dos grãos da matriz de sílica, destacado em (4).....	19
<b>Figura 5.</b> Exemplos de placas comerciais (a esquerda) e placas fabricadas em laboratório (a direita), nesta imagem as placas estão secando em estufa, após o procedimento de espalhamento da suspensão de sílica. <b>Fonte:</b> placa comercial Macherey-Nagel .....	20
<b>Figura 6.</b> Espalhamento da suspensão do adsorvente com o auxílio de um bastão de vidro. ....	21
<b>Figura 7.</b> Procedimento de desenvolvimento cromatográfico em CCD.....	22
<b>Figura 8.</b> (a) Matriz de sensores com uma zona ampliada para ilustrar a absorção de luz em. (b) Ilustração de como ocorre a conversão da luz em sinal elétrico, em seguida, a conversão do sinal em imagem e o armazenamento da mídia por meio de um processador. Adaptado google imagens .....	27
<b>Figura 9.</b> Cubo de cores do modelo RGB .....	29
<b>Figura 10.</b> Esquema de dimensões do papel cromatográfico utilizado. ....	36
<b>Figura 11.</b> Foto do recorte do papel ranhudo. ....	36
<b>Figura 12.</b> Suporte para aplicação das amostras onde [A] apresenta o local de aplicação e [B] o local indicado para o término da corrida [C] representa os suportes usados.....	37
<b>Figura 13.</b> Papel em formato cilíndrico posicionado no béquer para a realização da corrida.....	38
<b>Figura 14.</b> Bico adaptado para nebulização da solução reveladora.....	38
<b>Figura 15.</b> Visão geral e dimensões da caixa usada para fazer o ambiente de luz controlada [A]. Parte interna da tampa onde foram posicionados 168 LEDs de luz branca desligados (esquerda) e ligados (direita) [B]. Fundo da caixa onde é posicionado o papel usado para obtenção das medidas [C]. ....	39

<b>Figura 16.</b> Interface do programa utilizado na obtenção dos cromatogramas onde (A) indica a imagem do papel no ambiente de luz controlada (B) indica a região dos cromatogramas resultantes das leituras. (1) a (6) são os locais de configuração de largura, altura, coordenada x e coordenada y, posição e tamanho dos amostradores respectivamente. As configurações da corrida estão representadas pelos parâmetros de leituras em (C). .....	41
<b>Figura 17.</b> Sistema desenvolvido para a movimentação da placa cromatográfica. Visão geral do sistema (a), detalhe da mesa móvel (b) e circuito eletrônico de controle (c). ..	43
<b>Figura 18.</b> Imagens com detalhes do sistema de detecção por reflectância, para um sistema cromatográfico baseado em camada delgada de sílica. ....	43
<b>Figura 19.</b> Fibra óptica bifurcada, em (a) a fibra completa, em (b) extremidade da fibra responsável pela saída da radiação e absorção da reflexão e em (d) as extremidades da sonda. ....	44
<b>Figura 20.</b> Interface ao usuário do programa desenvolvido em linguagem VisualBasic 6.0 .....	46
<b>Figura 21.</b> Parte do papel utilizado na corrida cromatográfica contendo os íons $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ e $\text{Co}^{2+}$ , além da mistura dos mesmos e bandas cromatográficas explicitadas em cada canal. ....	49
<b>Figura 22.</b> Papel de corrida cromatográfica com amostras de $\text{Ni}^{2+}$ onde os seis canais iniciais apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro canais restantes amostra do íon utilizada e o tracejado apresenta a posição final de corrida do eluente. ....	51
<b>Figura 23.</b> Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de $\text{Cu}^{2+}$ . ....	52
<b>Figura 24.</b> Espectro de absorção $\text{Ni}^{2+}$ . ....	53
<b>Figura 25.</b> Espectro de absorção $\text{Cu}^{2+}$ . ....	53
<b>Figura 26.</b> Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de $\text{Ni}^{2+}$ . ....	54
<b>Figura 27.</b> Curva analítica obtida para determinação de $\text{Cu}^{2+}$ . ....	55
<b>Figura 28.</b> Curva analítica obtida para determinação de $\text{Ni}^{2+}$ . ....	55
<b>Figura 29.</b> Imagem, do papel cromatográfico, obtida pelo programa de análise para a determinação de $\text{Ni}^{2+}$ em amostras de moedas de cupro-níquel onde os seis primeiros canais (parte inferior) apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro últimos canais (parte superior da imagem) indicam as bandas da amostra em replicatas. ....	

Para realizar a leitura em uma única medida foi necessário partir o papel em duas partes e estas foram posicionadas um sobre a outra.....	57
<b>Figura 30.</b> Imagem, do papel cromatográfico, obtida pelo programa de análise para a determinação de $\text{Cu}^{2+}$ em amostras de moedas de cupro-níquel onde os seis primeiros canais (parte inferior) apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro últimos canais (parte superior da imagem) indicam as bandas da amostra em replicatas. Para realizar a leitura em uma única medida foi necessário partir o papel em duas partes e estas foram posicionadas um sobre a outra.....	57
<b>Figura 31.</b> Espectros obtidos para o $\text{Ni}^{2+}$ (a esquerda) e $\text{Cu}^{2+}$ (a direita), para as faixas de concentração de 2 a $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 32.</b> Curva analítica para a determinação de $\text{Cu}^{2+}$ (a esquerda) e $\text{Ni}^{2+}$ (a direita) com base nas áreas dos picos obtidas com medidas realizadas na faixa de 450 nm e 650 nm respectivamente. ....	59
<b>Figura 33.</b> Dispositivo proposto para CCD com 8 canais usinados em uma placa de alumínio durante a deposição de suspensão de sílica (A). Procedimento para secagem das placas em estufa (B). ....	64
<b>Figura 34.</b> Suporte para realizar as aplicações das soluções na placa cromatográfica em (A). Placa de CCD com 5 minutos de eluição em (B).....	65
<b>Figura 35.</b> Câmara para revelação e leitura cromatográfica sob radiação UV em 254 nm. ....	66
<b>Figura 36.</b> Filtro óptico de absorção, com transmitância em $500 \pm 20 \text{ nm}$ em (a) e em (b) o espectro de transmitância do filtro.....	66
<b>Figura 37.</b> Fotografia dos canais de sílica obtidos pela deposição de diferentes volumes ( $\mu\text{L}$ ) de suspensão de sílica (A), perfis de absorbância das superfícies dos canais preenchidos com diferentes volumes da suspensão de sílica (B) leituras de seis diferentes canais preenchidos com $700 \mu\text{L}$ (C) e respostas de absorbância ao longo uma canal de sílica obtido com a deposição de $700 \mu\text{L}$ de pasta de sílica (D). Indicação da posição e direção das medidas de absorbância (MA). * Medidas de absorbância realizadas em $500 \text{ nm}$ . ....	71
<b>Figura 38.</b> Imagens obtidas por microscopia confocal dos canais preenchidos com diferentes volumes de suspensão de sílica.....	73
<b>Figura 39.</b> Curvas analíticas para determinação de CAF à esquerda e ACM à direita. ....	74

<b>Figura 40.</b> Cromatogramas (A) e imagem da placa (B) para corridas com cafeína (1,0 a 6,0 mg mL <sup>-1</sup> ) e paracetamol (0,2 a 2,1 mg mL <sup>-1</sup> ) indicados pelos números 1 e 2, respectivamente .....	74
<b>Figura 41.</b> Fotografia do dispositivo proposto sob radiação UV (à esquerda) após a separação de CAF 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (1), ACM 4,4 mg mL <sup>-1</sup> (2) e os cromatogramas, baseados em imagens digitais adquiridos para os oito canais da placa. ....	75
<b>Figura 42.</b> Corrida cromatográfica dos padrões (1-4) e da amostra (5 e 6).....	76
<b>Figura 43.</b> Fotografia do dispositivo proposto sob radiação UV (A) e cromatograma baseado em imagens digitais (B) adquiridos nos oito canais. Pontos para CAF 1,50 mg mL <sup>-1</sup> , ACM 0,36 mg mL <sup>-1</sup> e AAS 2,25 mg mL <sup>-1</sup> (3). ....	77
<b>Figura 44.</b> (A) Imagem em escala de cinza do dispositivo sob radiação UV. Bandas cromatográficas dos analitos, CAF 0,50–3,00 mg mL <sup>-1</sup> (1), ACM 0,18–0,54 mg mL <sup>-1</sup> (2), AAS 0,70–4,50 mg mL <sup>-1</sup> (3) Indicação dos delimitadores de pixels (DP) e do sentido das leituras (SL). (B) Cromatogramas baseados em imagem adquiridos para CAF (1) 0,50 a 2,50 mg mL <sup>-1</sup> , ACM (2) 0,18 a 0,45 mg mL <sup>-1</sup> e AAS (3) 0,7 a 3,75 mg mL <sup>-1</sup> . Picos em linhas pontilhadas não foram usados para fins de calibração.....	78
<b>Figura 45.</b> Curvas analíticas para a determinação de CAF 0,50-2,50 mg mL <sup>-1</sup> em (A), ACM 0,18 a 0,45 mg mL <sup>-1</sup> em (B) e AAS 0,7 a 3,75 mg mL <sup>-1</sup> em (C) com base nas alturas dos picos obtidas com medidas realizadas por imagens digitais e revelação UV .....	80
<b>Figura 46.</b> Imagem, em escala de cinza, da placa sob radiação UV para a quantificação de CAF e AAS em amostra de medicamento (A) e imagem da placa após a separação cromatográfica da solução mais diluída da amostra para quantificação de ACM (B). A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> indicam os canais onde foram aplicadas as amostras e 1-5 indicam os canais onde foram aplicados os padrões, sendo estes crescentes para CAF e ACM e decrescentes para AAS. ....	81
<b>Figura 47.</b> Cromatograma (esquerda) e imagem da placa (direita) após a separação do padrão contendo CAF (1), ACM (2), AAS (3). A mesma solução foi aplicada em 5 canais. ....	82
<b>Figura 48.</b> Cromatograma (esquerda) e imagem da placa de CCD comercial (direita) após a separação do padrão contendo CAF (1), ACM (2), AAS (3). A mesma solução foi aplicada 5 vezes, na base da placa com distância de 1 cm entre cada aplicação.....	83

<b>Figura 49.</b> Cromatogramas (esquerda) e imagem da placa comercial de CCD (direita) para corridas com CAF (0,5 a 2,0 mg mL <sup>-1</sup> ), ACM (0,18 a 0,36 mg mL <sup>-1</sup> ) e AAS (0,70 a 3,00 mg mL <sup>-1</sup> ) indicados pelos números 1, 2 e 3, respectivamente.....	84
<b>Figura 50.</b> Cromatogramas (esquerda) e imagem do dispositivo proposto para CCD (direita) para corridas com CAF (0,5 a 2,5 mg mL <sup>-1</sup> ), ACM (0,18 a 0,45 mg mL <sup>-1</sup> ) e AAS (0,70 a 3,75 mg mL <sup>-1</sup> ) indicados pelos números 1, 2 e 3, respectivamente.....	85
<b>Figura 51.</b> Imagem da placa de CCD comercial (à esquerda) com volumes crescentes (sentido da seta) de aplicação da solução padrão. Dispositivo proposto (à direita) após separação de diferentes volumes da solução padrão aplicada (1 µL -9 µL).....	85
<b>Figura 52.</b> Suportes em PLA para CCD com quatro (A) e seis (B) canais .....	89
<b>Figura 53.</b> Deposição da suspensão de sílica nas placas.de PLA.....	90
<b>Figura 54.</b> Placa de CCD com 5 minutos de eluição.....	92
<b>Figura 55.</b> Imagem da placa de CCD proposta após a separação de levamisol (1) e cocaína (2). Os dois primeiros canais referem-se às corridas dos padrões puros e o último canal refere-se a corrida para mistura dos padrões.....	93
<b>Figura 56.</b> Cromatograma obtido para a separação de uma mistura de levamisol 5 mg mL <sup>-1</sup> (1) e cocaína 10 mg mL <sup>-1</sup> (2). .....	93
<b>Figura 57.</b> Imagem da placa de CCD proposta após a corrida com levamisol 5 mg mL <sup>-1</sup> . .....	94
<b>Figura 58.</b> Cromatogramas obtidos após a corrida com levamisol 5 mg mL <sup>-1</sup> .....	94
<b>Figura 59</b> Imagem da placa de CCD após a corrida com os padrões de Levamisol de 2 - 5 mg mL <sup>-1</sup> . .....	95
<b>Figura 60.</b> Cromatogramas obtidos após a corrida com Levamisol variando as concentrações de 2 a 5 mg mL <sup>-1</sup> . .....	96
<b>Figura 61.</b> Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores de área apresentados na Tabela 11. ....	97
<b>Figura 62.</b> Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores da altura do pico apresentados na Tabela 11. ....	97
<b>Figura 63.</b> Imagem da placa de CCD proposta após a corrida para mistura de levamisol 5 mg mL <sup>-1</sup> e cocaína 10 mg mL <sup>-1</sup> . .....	98
<b>Figura 64.</b> Cromatogramas obtidos para a separação de Cocaína base do Levamisol empregando-se uma placa com quatro canais. ....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de imagem usados nas medidas de amostras de Ni <sup>2+</sup> e Cu <sup>2+</sup> . . . . .	42
<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos para análise de níquel em amostras . . . . .	58
<b>Tabela 3.</b> Resultados obtidos para análises de cobre em amostras. . . . .	58
<b>Tabela 4.</b> Condições cromatográficas do HPLC-UV para determinação de CAF, ACM e AAS em medicamentos. . . . .	68
<b>Tabela 5.</b> Valores de concentração e seus respectivos erros. . . . .	76
<b>Tabela 6.</b> Fatores de retenção e alturas dos picos calculados para CAF (1,5 mg mL <sup>-1</sup> ), ACM (0,36 mg mL <sup>-1</sup> ) e AAS (2,25 mg mL <sup>-1</sup> ) com base no cromatograma descrito na Figura 2. . . . .	77
<b>Tabela 7.</b> Resultados para calibração e seus respectivos coeficientes de correção linear baseados nas alturas dos picos e limites de detecção estimados. . . . .	79
<b>Tabela 8.</b> Resultados para a determinação de CAF, ACM e AAS em comprimidos comerciais de analgésicos para enxaqueca. . . . .	81
<b>Tabela 9.</b> Resultados para calibração e seus respectivos coeficientes de correção linear baseados nas alturas dos picos e limites de detecção estimados para as separações realizadas na placa de CCD comercial e na placa de CCD lab-made proposta. . . . .	84
<b>Tabela 10.</b> Resultados encontrados para as corridas com levamisol 5 mg mL <sup>-1</sup> . . . . .	94
<b>Tabela 11.</b> Valores de área e altura encontrados para os picos cromatográficos apresentados na Figura 61 e Figura 62 . . . . .	97
<b>Tabela 12.</b> Valores de, R <sub>f</sub> , áreas dos picos, média, desvio padrão e CV (%) para a separação de Cocaína base do Levamisol. . . . .	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

CL	Cromatografia Líquida
CCD	<i>Charge Coupled Device Do Inglês</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CS	Cromatografia Supercrítica
ACM	Acetaminofeno
AAS	Ácido Acetilsalicílico
CAF	Cafeína
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide Semiconductor Do Inglês</i>
CCD	Cromatografia Em Camada Delgada
CP	Cromatografia Em Papel
DP	Delimitadores De Pixels
DP	Desvio Padrão
ER	Erro Relativo
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
RF	Fator De Retenção
LD	Limite De Detecção
RGB	Red, Green, Blue
SH	Sibutramina

## Resumo

Este trabalho descreve uma abordagem simples, de baixo custo e inovadora para a realização de análises quantitativas por cromatografia em camada delgada combinada com a detecção baseada em imagem com revelação UV, que permite a aquisição de cromatogramas. Dispositivos de TLC de alumínio feitos de laboratório contendo oito canais individuais com finas camadas de sílica fluorescente foram desenvolvidos, avaliados e utilizados para realizar a separação e quantificação de acetaminofeno (ACM), cafeína (CAF) e ácido acetilsalicílico (AAS) em comprimidos de medicamentos usando detecção baseada em imagem realizada com uma webcam e software escrito em VisualStudio. O dispositivo proposto permite o desenvolvimento vertical da separação com reprodutibilidade adequada dos fatores de retenção (<2%) e das alturas dos picos (<8%), sem ocorrência de danos na sílica, demonstrando a aplicabilidade dessa nova abordagem. Utilizando uma mistura de acetato de etila / ácido acético (80:2 v / v) como eluente, curvas analíticas foram obtidas para os analitos com base nas alturas dos picos cromatográficos, proporcionando relações lineares ( $R > 0,996$ ) para as faixas de concentração estudadas ACM (0,18-0,54 mg mL<sup>-1</sup>), CAF (0,50–3,00 mg mL<sup>-1</sup>) e AAS (0,70–4,50 mg mL<sup>-1</sup>) com limites estimados de detecção (LOD) de 0,14 mg mL<sup>-1</sup>, 0,40 mg mL<sup>-1</sup> e 0,56 mg mL<sup>-1</sup>, para ACM, CAF e ASA, respectivamente. Além disso, não foram observadas diferenças significativas (nível de confiança de 95%) comparando a concentração média dos analitos determinada pelo método proposto e as obtidas por um método baseado em HPLC de referência, indicando uma precisão adequada dos procedimentos. O sistema de detecção desenvolvido também mostrou-se uma alternativa viável, satisfatória e prática para a quantificação de amostras de ligas metálicas por cromatografia em papel, minimizando assim os erros de subjetividade de análises visuais que são comumente utilizadas nesse tipo de cromatografia, proporcionando maior confiança aos resultados.

**Palavras-chave:** cromatografia em camada delgada, análise quantitativa, detecção baseada em imagens digitais Instrumentação Analítica

## Abstract

This work describes a simple, low cost and innovative approach to quantitative analysis by thin layer chromatography combined with image-based detection with UV development, which allows the acquisition of chromatograms. Laboratory-made aluminum TLC devices containing eight individual channels with thin layers of fluorescent silica were developed, evaluated, and used to perform the separation and quantification of acetaminophen (ACM), caffeine (CAF) and acetylsalicylic acid (ASA) using image-based detection performed with a webcam and software written in VisualStudio. The proposed device allows the vertical development of the separation with adequate reproducibility of the retention factors (<2%) and peak heights (<8%), without damaging the silica, demonstrating the applicability of this new approach. Using a mixture of ethyl acetate / acetic acid (80:2 v/v) as the eluent, analytical curves were obtained for the analytes based on the heights of the chromatographic peaks, providing linear ratios ( $R > 0.996$ ) for the concentration ranges studied ACM (0.18-0.54 mg mL<sup>-1</sup>), CAF (0.50-3.00 mg mL<sup>-1</sup>) and AAS (0.70-4.50 mg mL<sup>-1</sup>) with estimated detection limits (LOD) of 0.14 mg mL<sup>-1</sup>, 0.40 mg mL<sup>-1</sup> and 0.56 mg mL<sup>-1</sup> for ACM, CAF and ASA, respectively. In addition, no significant differences (95% confidence level) were observed comparing the mean concentration of the analytes determined by the proposed method and those obtained by a reference HPLC-based method, indicating an adequate accuracy of the procedures. The developed detection system also proved to be a viable, satisfactory and practical alternative for the quantification of metal alloy samples by paper chromatography, thus minimizing the subjectivity errors of visual analysis that are commonly used in this type of chromatography, providing greater confidence results.

**Key words:** thin-layer chromatography, quantitative analysis, digital image-based detection Instrumentation

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução e Objetivos**

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 100 anos, a cromatografia evoluiu de uma simples técnica de separação de pigmentos para um conjunto de técnicas capazes de separar, purificar e detectar os componentes de uma amostra, mesmo com matrizes complexas. No decorrer desses anos, muitos foram os estudos que contribuíram para sua evolução, com melhoras na eficiência de separação e conseqüentemente nos resultados.<sup>1</sup>

Atualmente, muitas técnicas cromatográficas estão disponíveis e podem ser classificadas em diferentes modalidades de acordo com a forma física do sistema em:

- **Cromatografia em Coluna:** Cromatografia líquida (CL), gasosa (CG) e supercrítica (CS);
- **Cromatografia Planar:** Cromatografia em papel (CP), em camada delgada (CCD), em camada delgada de alto desempenho (CCDAE) e cromatografia em camada preparativa (CCP).<sup>2</sup>

De fato, para aplicações quantitativas, as técnicas em coluna destacam-se em relação àquelas de cromatografia planar sendo as mais empregadas atualmente para esse tipo de aplicação. Contudo, aplicações quantitativas com cromatografia planar têm sido reavaliadas nos dias de hoje com o objetivo de diminuição de custo e rapidez das análises intrínsecas a esse tipo de estratégia.

Dentro das estratégias de cromatografia planar, a CP é uma técnica que destaca-se pela simplicidade, necessidade de pequena quantidade de amostra e é aplicável preferencialmente na separação e identificação de compostos polares apresentando boa resolução na separação destes.<sup>3</sup> Essa técnica também é muito útil na separação de íons metálicos, algumas substâncias orgânicas, componentes em alimentos (aminoácidos, proteínas, vitaminas etc.)<sup>4</sup> e separação de pigmentos.<sup>5</sup>

Como vantagens a CP não necessita de equipamentos caros para sua realização, é uma técnica de execução relativamente rápida, adequada para análises de rotina de um grande número de amostras pode ser considerada uma ferramenta útil para a determinação qualitativa e semi-quantitativa de uma variedade de amostras. Apesar das vantagens inerentes dessa técnica, algumas limitações são observadas como, alargamento de banda, difusão, necessidade de reveladores, baixa resolução e sensibilidade.<sup>6</sup>

Já a CCD é uma técnica de cromatografia planar mais utilizada que a CP e que permite uma separação bastante rápida dos componentes de uma amostra. Embora o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, com o intuito de melhorar os resultados

seja altamente explorado, ainda há uma tendência em utilizar a CCD como método para análises devido suas vantagens, tais como: baixo custo, uso de equipamentos de laboratório simples e amplamente disponíveis, portabilidade (uso de campo), capacidade de realizar a separação de várias amostras em paralelo, não havendo a necessidade de um especialista para execução dos procedimentos e pouca ou nenhuma exigência de preparo de amostras. Essas características tornaram-na uma técnica de separação útil principalmente para fins de análise qualitativa.<sup>7</sup>

Por se tratar de uma técnica simples e economicamente viável, a CCD está presente na maioria dos laboratórios de química, potencialmente aplicada na separação de compostos orgânicos (aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos, aminoácidos e outros) e inorgânicos no monitoramento de sínteses e purificações de amostras.<sup>8</sup>

Para propósitos quantitativos em CCD, o uso de placas fabricadas por processos industriais é altamente recomendado por atingir propósitos desejáveis como: precisão do  $R_f$  e das intensidades de cor dos pontos detectáveis. Entretanto, em alguns casos, essas placas pré fabricadas podem elevar o custo para aplicações.<sup>9</sup>

Um dos avanços mais importantes para a CCD está no uso de estratégias que permitam a detecção das substâncias separadas, possibilitando a execução de ensaios semi-quantitativos e quantitativos. Embora a detecção direta, por densitometria óptica de varredura, seja mais comumente utilizada, há a necessidade de utilização de instrumentos de custo elevado para a realização dos ensaios. Além disso, pode haver ainda limitações relacionadas a portabilidade e a familiarização do analista com os procedimentos, tornando o método pouco atrativo para algumas aplicações.<sup>10</sup>

Com a revolução digital iniciada no século XX, houve uma transformação na indústria, na economia, na ciência e na sociedade. O desenvolvimento de câmeras digitais, permitiu que novos detectores fossem criados, sendo possível a aplicação desses em diversas áreas, inclusive em cromatografia planar, isso porque, a detecção se tornou mais simples e menos dispendiosa quando comparado aos densitômetros clássicos. Assim a avaliação densitométrica por imagens digitais das placas de CCD e do papel em CP tornou-se predominante.<sup>11</sup>

A detecção utilizando imagens digitais foi empregada no final dos anos 1990. A partir disso, houve um crescimento exponencial da utilização desse sistema de detecção para obtenção de dados qualitativos e quantitativos visando determinações analíticas.<sup>12</sup>

Parte do sucesso da aplicação de imagens digitais em determinações analíticas deve-se a características relevantes desse método, como a diminuição no custo da análise, substituição de equipamentos de custo elevado, portabilidade e simplicidade.<sup>13</sup>

Os sistemas para detecção por imagem digital descritos na literatura até o presente momento são baseados no uso de dispositivos como, câmeras digitais, *webcams*, scanners e smartphones para a obtenção de imagens de um sistema analítico em estudo e na posterior avaliação desta imagem com objetivo de obter informações qualitativas e/ou quantitativas.<sup>14</sup> Trabalhos descritos na literatura mostram que medidas relacionadas à absorção e/ou emissão de radiação por um analito podem ser facilmente realizadas a partir desta estratégia.<sup>15</sup>

Para a conversão da imagem em um sinal analítico capaz de ser interpretado utiliza-se modelos de cores. Um modelo de cores é um modelo matemático que transcreve as cores em números possibilitando a extração de informações relacionadas às cores do objeto em estudo. Assim, utilizando a eletrônica correta e ferramentas de programação é possível converter os sinais em cores e vice versa.

Um dos modelos de cores mais empregados, o modelo de cores RGB, se baseia em um sistema tricromático de discernimento de cores, onde a mistura de cores primárias aditivas, vermelho (do inglês *Red*), verde (do inglês *Green*) azul (do inglês *Blue*) em diferentes combinações/proporções e níveis de intensidade podem simular todas as cores do espectro eletromagnético na região do visível.<sup>16</sup>

Com os valores numéricos obtidos pela decomposição das cores, por meio de um software adequado, estabelece-se uma correlação ,através de algoritmos específicos, capaz de adquirir o sinal analítico para determinações qualitativas e quantitativas com desempenho adequado.<sup>14,15</sup>

O que é possível observar nos sistemas descritos na literatura é que, de modo geral, são necessárias várias etapas, após a aquisição da imagem, para se obter os resultados analíticos, fazendo com que a análise e interpretação dos dados não aconteça simultaneamente em tempo real.<sup>17,18,19</sup>

Até o presente momento, não foi encontrado na literatura um sistema que permite a obtenção da imagem e aquisição simultânea do sinal analítico, sem a necessidade de pré processamento da imagem, sobretudo quando se emprega este tipo de estratégia de detecção em métodos de cromatografia planar como CP e CCD.<sup>20</sup> De fato, para essa estratégia específica de determinação, os resultados são usualmente obtidos analisando-

se um a um os spots (bandas) separados no papel ou placa, não sendo registrados picos cromatográficos, o que aumenta demasiadamente o tempo de análise.

Considerando esses aspectos, o presente trabalho colaborou para o desenvolvimento de um sistema de detecção por imagens digitais que permite a análise em tempo real a partir da aquisição de cromatogramas baseados em imagens digitais, eliminando a necessidade de pré-processamento da imagem e avaliação individual dos spots separados por cromatografia planar. Além disso, o trabalho demonstra a possibilidade de fabricação de placas para a realização de CCD no próprio laboratório com desempenho similar ao das placas comerciais que permite a determinação quantitativa de analitos com custo substancialmente menor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo geral facilitar, diminuir os custos e tornar mais rápida as análises quantitativas baseadas em cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada a partir de uma nova estratégia de detecção baseada em imagens digitais obtidas com uma *webcam* e da fabricação em laboratório de placas para CCD suficientemente eficientes para aplicações quantitativas.

### 2.2 Específicos

Os objetivos específicos dessa tese são:

- Desenvolver e avaliar *softwares* para a detecção baseada em imagens digitais e em medidas espectrofotométricas aplicadas a cromatografia planar
- Propor e avaliar alternativas para a fabricação de placas para cromatografia em camada delgada em laboratório e aferir o seu desempenho analítico
- Otimizar e avaliar o desempenho analítico dos sistemas propostos na separação e quantificação de Cafeína, Paracetamol e Ácido Acetilsalicílico em medicamentos por cromatografia em camada delgada.
- Otimizar e avaliar o desempenho analítico dos sistemas propostos na separação e quantificação de metais em ligas por meio da cromatografia em papel.

# **CAPÍTULO 2**

## **Revisão Bibliográfica**

### 3. BREVE HISTÓRICO DA CROMATOGRAFIA

Muitos são os registros de fenômenos relacionados à cromatografia, há indícios que o primeiro cientista a relatar esse fenômeno foi Caio Plínio Segundo que descreveu, no ano de 77 d.C., um método que consistia na verificação da autenticidade de *verdigris* (um sal fabricado pela reação do metal cobre com ácido acético), que era aplicado em folhas de papiro embebidas com um extrato vegetal, caso o sal estivesse puro o papiro tornava-se imediatamente negro.<sup>1,21</sup>

Contudo, é considerado como marco inicial da invenção da cromatografia o relatório de Tswett, publicado em 1903, considerando este pesquisador o “pai” da cromatografia que, ao realizar testes de solubilidade com seus extratos de plantas, observou que ao secar um extrato de clorofila em papel de filtro, sob vácuo, este se tornava verde, sendo possível extrair seletivamente do papel de filtro os carotenos e a clorofila.<sup>22</sup>

Tswett concluiu que os pigmentos e a celulose do papel de filtro estavam envolvidos em um fenômeno de adsorção, e que estudos sistemáticos desta questão trariam luz ao fenômeno de adsorção e permitiriam a elaboração de uma nova técnica de separação física de substâncias.

Tswett continuou os estudos testando agora outros materiais adsorventes e concluiu que: “Com base no que precede, um novo método de separação física de diferentes substâncias em meios orgânicos pode ser proposto. O princípio deste método baseia-se na propriedade de substâncias dissolvidas sofrerem processo de adsorção em materiais sólidos de origem mineral e orgânica. O montante da substância encontrada no composto de adsorção depende do grau de moagem, bem como da sua natureza, da natureza da substância dissolvida, e da natureza do solvente. Todas estas diferenças podem ser utilizadas para a separação da substância por meio de sua precipitação fracionada de adsorção [...] Sem qualquer dúvida, uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de adsorção levaria à perfeição da sua aplicação analítica”.<sup>17</sup>

Anos se passaram e com o aperfeiçoamento dos estudos de Tswett, Martin e Synge (1941)<sup>23</sup> publicaram o primeiro artigo que trouxe uma nova forma de cromatografia baseada na separação pelo fenômeno da partição, utilizando um suporte sólido (sílica gel) para imobilizar a fase estacionária (FE) líquida (água) enquanto que a fase móvel (FM) também era líquida (ou gasosa) e imiscível na FE. A separação era fundamentada na diferença de partição das substâncias entre as duas fases líquidas e, por essa invenção, Synge e Martin receberam o prêmio Nobel de Química em 1952.<sup>38</sup>

A partir desses estudos muito se evoluiu nas pesquisas sobre métodos cromatográficos como a descoberta de outros sólidos para suportar a FE, bem como o desenvolvimento de colunas, gradientes de eluentes, detectores, e outros métodos cromatográficos como a cromatografia gasosa, cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia supercrítica e vantagens como a sensibilidade, velocidade, exatidão e, simplicidade para separação, identificação e determinação de substâncias resultaram em um grande desenvolvimento desse método, sendo a cromatografia hoje, responsável por mais de 70% da Química Analítica.<sup>21</sup>

O mecanismo básico de separação que rege a cromatografia é a distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases, sendo que uma fase permanece parada, chamada de estacionária, à medida que a outra se move através dela, sendo denominada FM.

A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas dos analitos ora estão retidas na FE ora deslocam-se com a FM. De fato, enquanto a FM percorre a FE, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela FE, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes. A separação entre as substâncias será resultado da diferença de suas constantes de equilíbrio de distribuição entre as duas fases.<sup>24</sup>

Assim, com a ampla variedade de métodos cromatográficos disponíveis alguns critérios são utilizados para classificar as diferentes modalidades, sendo os mais comuns relacionados à forma física do sistema, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fase utilizadas.

A disposição da FE no suporte definirá a classificação da técnica: Caso a FE seja colocada em um tubo cilíndrico a técnica será chamada de cromatografia em coluna ou caso seja disposta sobre uma superfície plana ter-se-á a cromatografia planar. A partir destas classificações, dois grupos são gerados que subdividem-se em:

- **Cromatografia em Coluna:** Cromatografia líquida (CL), gasosa (CG) e supercrítica (CS);
- **Cromatografia Planar:** Cromatografia em papel (CP), em camada delgada (CCD), em camada delgada de alto desempenho (CCDAE) e cromatografia em camada preparativa (CCP).<sup>2</sup>

Devido as vantagens da cromatografia planar, tais como: praticidade, simplicidade entre outras, essas técnicas serão abordadas com mais detalhes a seguir:

#### **4. CROMATOGRAFIA PLANAR**

Em cromatografia planar a FM deve ser líquida, enquanto que, a FE pode ser sólida ou líquida. Caso a FE seja líquida, o líquido deverá estar suportado e/ou ligado quimicamente a um suporte sólido e a polaridade de ambas as fases deve ser levada em consideração, pois este fator determinará se o tipo da cromatografia será normal (quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel) ou reversa (quando a fase móvel é mais polar que a fase estacionária), enquanto que os processos físicos (adsorção ou partição), químicos e mecânicos, determinaram os mecanismos de separação.<sup>25</sup>

A cromatografia planar compreende todas as técnicas cromatográficas que utilizam uma FE aberta plana, são elas: a cromatografia em papel (CP) cromatografia de camada delgada (CCD) e mais recentemente desenvolvida a cromatografia planar de fluxo forçado. Da CCD derivaram a cromatografia de camada delgada de alta eficiência, cromatografia de camada ultrafina, cromatografia em camada preparativa.<sup>2</sup>

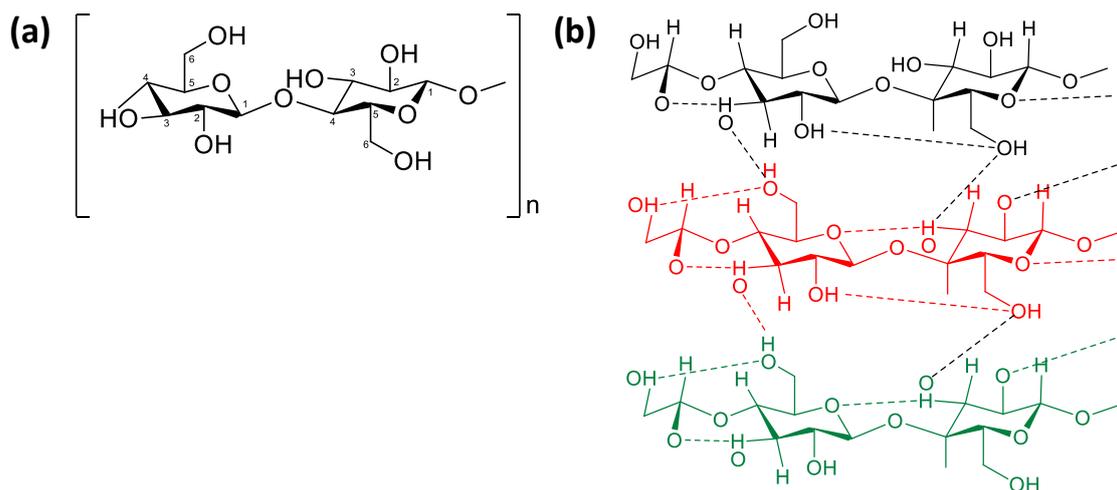
##### ***Cromatografia em Papel (CP)***

O uso do papel em Química Analítica não é recente, e dentre as aplicações possíveis com esse substrato, tem-se a cromatografia em papel, um importante método de separação que foi amplamente estudado na década de 1940 e que resultou na contemplação a Martin e Synge com o Prêmio Nobel de química em 1952.<sup>26</sup> Essa foi a primeira onda significativa de aplicações de papel em separações cromatográficas.

Trata-se de uma técnica simples que necessita de pequena quantidade de amostra, é aplicável preferencialmente na separação e identificação de compostos polares, apresentando boa resolução na separação destes.<sup>3</sup>

A CP é uma técnica cromatográfica do tipo líquido-líquido, em que o papel funciona como suporte para FE líquida polar, enquanto que a amostra, após ser depositada no papel, será eluída por uma FM líquida (menos polar que a FE). A celulose, principal constituinte do papel,<sup>27</sup> é um homopolissacarídeo sem ramificações composto unidades de D-glicose (Figura 1-a). Essas unidades de D-glicose são ligadas por átomos de oxigênio, que interagem entre si de modo a formar uma rede estabilizada por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 1-b) que dá origem às fibras do papel, com característica porosa, permeável e hidrofílica.<sup>28</sup>

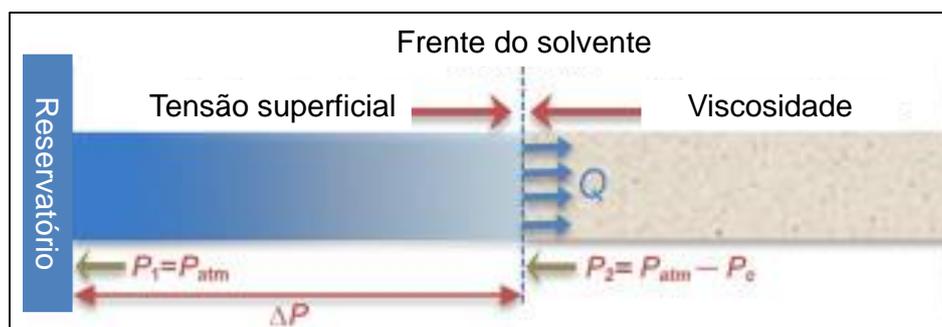
A principal função do papel nesse tipo de cromatografia é atuar como suporte para a FE líquida. Assim líquidos polares (preferencialmente água) são adsorvidos e formam ligações de hidrogênio com a celulose, ficando retido e funcionando como FE. Enquanto que, solventes apolares, são repelidos e atuam como FM. O mecanismo de separação, baseia-se na solubilidade dos componentes da mistura na FE e na FM. Componentes mais solúveis na FE aquosa ficarão mais retidos e portanto, migram mais lentamente, enquanto que substâncias menos solúveis, ou que não tenham a capacidade de formar ligações de hidrogênio possuem migração mais rápida e menor retenção.<sup>29</sup>



**Figura 1.** (a) Estrutura de repetição da celulose formada por duas moléculas de D-glicose e (b) Esquema ilustrativo das interações intra e intermoleculares na celulose.

As fibras presentes no papel possuem um ordenamento (Figura 1-b) que permite a realização do transporte do fluido espontaneamente.

A essa movimentação do fluido através dos poros do papel sob ação da força capilar (principal mecanismo de condução de fluxo) dá-se o nome de fluxo lateral e esse fluxo é mantido pela diferença de pressão entre a área molhada e a área seca na frente do líquido onde a pressão é menor, como pode ser observado na Figura 2. O transporte através do fluxo lateral apresenta vantagens instrumentais, uma vez que por ser espontâneo, não requer a utilização de equipamentos externos tais como fontes de alta tensão e bombas para realizar a eluição.<sup>30</sup>



**Figura 2.** Esquema das forças envolvidas no fluxo capilar em fibras de papel.  $P_{atm}$ : pressão atmosférica,  $P_c$ : pressão devido a forças capilares,  $Q$ : fluxo de fluido,  $\Delta P$ : queda de pressão. Adaptada da ref.<sup>30</sup>

O parâmetro utilizado para a análise em CP (e em CCD) é o fator de retenção ( $R_f$ ) de um composto. O  $R_f$  é definido como a razão entre a distância percorrida pela banda do componente e a distância percorrida pelo eluente após a eluição cromatográfica, assim, esse fator é diretamente dependente da FE utilizada e é expresso pela equação:

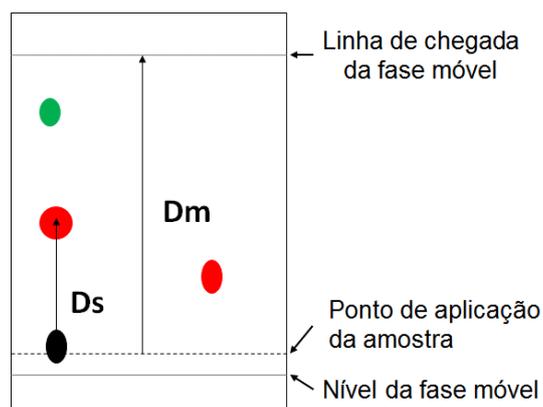
$$R_f = \frac{D_s}{D_m}$$

Onde:

$D_s$  = distância percorrida pela substância.

$D_m$  = distância percorrida pela FM.

O processo de análise por cromatografia planar segue uma ordem determinada. Uma linha para aplicação de amostra é determinada para garantir que todos os compostos analisados interajam de maneira igual com o eluente e a fase estacionária e outra linha é demarcada na extremidade oposta, denominada, linha de chegada da fase móvel (Figura 3). A importância de delimitar os pontos de início e fim da aplicação e da corrida do eluente se dá pelo interesse no  $R_f$  da amostra. Comparações do valor de  $R_f$  da amostra com o de um padrão é o método qualitativo mais utilizado em CP e em CCD.<sup>25</sup>



**Figura 3.** Esquema ilustrativo do desenvolvimento cromatográfico em CP

O valor do  $R_f$  é considerado constante, para o mesmo composto, submetido as mesmas condições de separação.

A eluição com o solvente em CP pode ser realizada de cinco modos diferentes: Ascendente, descendente, horizontal, radial ou bidimensional. Na primeira, o papel é introduzido no solvente, colocado no fundo da cuba cromatográfica, que elui de modo ascendente por capilaridade, rapidamente no início e diminui gradativamente a medida que a força ascendente da capilaridade for neutralizada pela ação da gravidade, até parar por completo.<sup>4</sup>

No segundo, a amostra é depositada na parte superior do papel e esse é colocado em uma cuba específica em que o solvente de eluição fica acima da extremidade final do papel. Nesse caso o solvente migra através do papel de cima para baixo, por capilaridade e gravidade.<sup>4</sup>

No fluxo horizontal, a migração do solvente acontece de um lado para o outro, na posição horizontal. Na eluição radial, o solvente é colocado no centro do papel (usualmente circular) e as bandas distribuem-se ao redor desse centro, com o solvente migrando por fluxo radial e capilaridade, banda.<sup>4</sup>

Por último, a eluição bidimensional consiste na realização de duas etapas, na primeira, a FM é deslocada ascendentemente e, depois, numa segunda etapa, gira-se o papel 90° e faz-se um novo deslocamento ascendente.<sup>4</sup>

A CP é uma técnica que exige controle rigoroso das condições pois sua resolução e reprodutibilidade são influenciadas por muitas variáveis como, aplicação da amostra, tipo de papel utilizado, temperatura, saturação da cuba cromatográfica com o solvente de eluição entre outras.<sup>25</sup>

A escolha do papel cromatográfico, é uma variável muito importante e a uniformidade é a principal característica que deve ser atendida, tanto em sua composição como em sua superfície. Atualmente existe uma grande quantidade de papeis comerciais que apresentam diferentes propriedades como controle de velocidade de fluxo, espessuras distintas, o que permite aplicar volumes maiores ou menores de amostras, e papeis previamente lavados com ácido, e ainda papeis com superfície modificada para usos especiais.<sup>31</sup>

A FM nessa classe de cromatografia é a variável que apresenta maior influência sob a análise, pois atua diretamente na separação dos componentes da mistura. A escolha da FM deve levar em consideração as propriedades químicas das substâncias presentes na mistura que se deseja separar e as propriedades físicas e químicas da FM. A

temperatura também influencia na separação, atuando diretamente na velocidade da análise e, conseqüentemente no tempo de interação entre a FM, FE e soluto afetando a resolução da técnica.<sup>32</sup>

Após a realização da separação, o papel é retirado da cuba cromatográfica e seco. Para a visualização das bandas incolores, o analista pode utilizar reagentes cromogênicos para a revelação ou tratar o papel com solução de fluoresceína para destacar as bandas quando expostas sob luz ultravioleta. Após a revelação das bandas cromatográficas uma resposta qualitativa e/ou quantitativa pode ser obtida diretamente no papel ou extraída dele.<sup>32</sup>

A CP é muito útil na separação de compostos polares e íons metálicos, sendo aplicada na determinação de componentes em alimentos (aminoácidos, proteínas, vitaminas etc.)<sup>4</sup> e na separação de pigmentos.<sup>5</sup>

Nos últimos anos, a CP continua a ser aplicada de forma qualitativa ou quantitativa em diversas amostras e analitos empregando-se diferentes formas de detecção. Zhang et al.<sup>33</sup> acoplaram a espectroscopia Raman isolada por nanopartículas com cromatografia em papel, para desenvolver um método fácil para a separação e detecção de dois isômeros estruturais 4,4'-bipiridina e 2,2'-bipiridina. O método estabelecido apresentou alta sensibilidade e boa nas técnicas cromatográficas planares.

Li e colaboradores<sup>34</sup> quantificaram ácido  $\gamma$ -aminobutírico (principal neurotransmissor inibitório no cérebro de mamífero) por meio da análise indireta do papel eluído com *n*-butanol-ácido acético-água (5:3:2) contendo ninhidrina. Nesse trabalho, as bandas de GABA (ácido gama aminobutírico) foram cortadas do papel e foram extraídas com álcool e sulfato cúprico para posterior análise do extrato resultante em um espectrofotômetro UV-Vis.

Outro grupo de pesquisa<sup>35</sup> combinou a cromatografia em papel com um método de detecção quimiluminescente para a determinação de 2,2 diclorovinil dimetilfosfato (diclorvós) em frutas e vegetais. As vantagens apresentadas pela CP nessa aplicação foram: rápido tempo de desenvolvimento e de análise e boa resolução, entretanto a quantificação nesse método foi de modo indireto, sendo necessário um analisador de luminescência não portátil e de custo elevado.

A CP também fundamentou o desenvolvimento de dispositivos para teste no ponto de atendimento (*point of care*) permitindo o diagnóstico in loco.<sup>36,37,38</sup> Esses dispositivos associam as vantagens da CP às vantagens da microflúidica.

A CP é vantajosa porque não necessita de equipamentos caros para sua realização, é uma análise de execução relativamente rápida, adequada para análises de rotina de um grande número de amostras, é uma ferramenta útil para a determinação qualitativa e semi-quantitativas de uma variedade de amostras. Contudo, limitações como alargamento e difusão das bandas, dificuldade na reprodutibilidade e na determinação do  $R_f$ , necessidade de reveladores, são encontradas.<sup>6</sup>

#### **4.2 Cromatografia em Camada Delgada**

A CCD é uma das técnicas de separação mais populares e usadas em análises qualitativas. As razões para isso são muitas e incluem, o processamento de amostras em paralelo, acessibilidade da amostra para avaliação pós separação cromatográfica, detecção na presença da FE independente das propriedades da FM, não necessita (na maioria das vezes) de preparo de amostra, facilidade de uso, velocidade na separação, custo relativamente baixo e portabilidade.<sup>39</sup> É aplicada à separação de diversos analitos em amostras variadas como: aminoácidos de proteínas de alimentos,<sup>40</sup> extratos de plantas,<sup>41</sup> esteroides em urina<sup>42</sup> e outras, com sensibilidades da ordem de um micrograma.<sup>43</sup>

Embora estejam disponíveis técnicas mais sofisticadas de separação e que podem produzir resultados principalmente com maior sensibilidade, ainda há uma tendência em utilizar a CCD como método para análises devido às suas vantagens intrínsecas.<sup>7</sup>

Em 1938 Izmailov e Sharaiber<sup>44</sup> descreveram pela primeira vez a CCD, contudo, o procedimento não foi amplamente aceito em seus primeiros anos devido a não homogeneidade no revestimento das placas. Somente quando Stahl, em 1958,<sup>45</sup> descreveu aparatos e substâncias sorventes que demonstraram-se eficazes na preparação das placas que seu uso passou a ser amplamente difundido e aplicado em qualquer laboratório que envolva análises de substâncias orgânicas e organometálicas. Em 1965 Stahl publicou o livro *Thin Layer Chromatography: a laboratory handbook*<sup>46</sup> que foi o marco inicial para expansão dessa técnica.

Trata-se de uma técnica cromatográfica do tipo líquido-sólido onde a FM líquida, migra sobre a FE sólida e o mecanismo de separação se dá, principalmente, por meio de processos físicos de adsorção (cromatografia em fase normal) que se baseia em: formação de ligações de hidrogênio, atrações do tipo dipolo-dipolo (força de Van der Waals), ou atrações coulômbicas.<sup>25</sup>

A separação acontece quando forças intermoleculares de atração entre as moléculas da fase fluida e da superfície sólida são maiores que as forças atrativas entre

as moléculas do próprio fluido.<sup>47</sup> Este tipo de separação é reversível, pois decorre da ação de forças intermoleculares fracas entre o adsorvente e as moléculas adsorvidas onde não ocorre formação ou quebra de ligações, e conseqüentemente, não altera a natureza química do adsorvato. Outra peculiaridade da fisissorção é a possibilidade de haver várias camadas de moléculas adsorvidas.<sup>48</sup> A adsorção física é, em geral, rápida, mas pode ser lenta se estiver envolvida com a ocupação de um meio poroso.<sup>47</sup>

A adsorção é um processo de transferência de massa, que consiste na habilidade de certos sólidos concentrar em suas superfícies determinadas substâncias existentes em fluidos líquidos ou gasosos, possibilitando a separação dos componentes desses fluidos. Assim, os componentes adsorvidos, denominados adsorvato ou adsorbato, concentram-se sob à superfície externa do sólido denominado adsorvente e, quanto maior a área superficial deste sólido, mais favorável será a adsorção.<sup>49</sup>

De acordo com a natureza das forças envolvidas, a adsorção pode ser classificada quanto a sua intensidade em: adsorção física (fisissorção) e adsorção química (quimiossorção). Na adsorção física, ocorre apenas uma interação, relativamente fraca, entre o adsorvente e o adsorvato, por meio de atrações dipolares, ligações de hidrogênio ou interações coulômbicas que são similares às forças de coesão molecular.

Por outro lado, a quimiossorção, envolve a troca ou partilha de elétrons entre as moléculas do adsorvato e a superfície do adsorvente, através de uma reação química, promovendo assim, a formação de uma nova ligação, portanto, trata-se de um fenômeno bem mais forte que a adsorção física.<sup>49</sup>

Apesar de os dois mecanismos de adsorção não serem completamente independentes a CCD de fase normal possui majoritariamente o processo de adsorção física, que apresenta algumas características próprias, tais como: a inespecificidade, pois o adsorvato não se liga ao adsorvente através de sítios específicos, ela ocorre em toda a superfície adsorvente, de forma não localizada, ao passo que a adsorção química é localizada pois só pode ocorrer nos sítios ativos da FE. Do ponto de vista termodinâmico, o calor envolvido na fisissorção é baixo (menor que 10 kcal/mol), equiparado a um processo de condensação/vaporização.<sup>50</sup>

Os processos de separação por adsorção estão baseados em três mecanismos distintos: os mecanismos cinéticos, os mecanismos de equilíbrio e o mecanismo estérico. O mecanismo cinético está baseado nas diferentes difusividades das diversas espécies nos poros adsorventes.<sup>51</sup>

Enquanto os mecanismos de equilíbrio, consistem na habilidade de diferentes sólidos em acomodar diferentes espécies de adsorvatos, que estão adsorvidos em outros compostos na fase fluida. Já no mecanismo estérico, os poros do material adsorvente possuem dimensões características, os quais permitem a entrada de determinadas moléculas, excluindo as demais, estabelecendo assim um processo de seletividade da técnica.<sup>52</sup>

Por ser resultado de uma combinação entre diferentes tipos de forças intermoleculares, o fenômeno de adsorção possui vários fatores que o influenciam, tais como: as condições operacionais de temperatura, pH do meio, natureza do solvente, adsorvente e adsorvato.<sup>53</sup> Dentre esses fatores, as características do adsorvente (e do adsorvato) são preponderantes e influenciam diretamente nas separações.

Aspectos como a área superficial, tamanho do poro, densidade, grupos funcionais presentes na superfície e hidrofobicidade do material devem ser avaliados antes da escolha da FE bem como, a polaridade, o tamanho da molécula, a solubilidade e o pH do adsorvato também devem ser levados em consideração.<sup>51</sup>

Na CCD a FE é constituída por uma camada de sólido adsorvente que é finamente distribuído sob uma superfície rígida e inerte, (vidro, alumínio ou plástico) a esse conjunto, dá-se o nome de placa cromatográfica. Tanto para fabricação de placas, como para a aquisição destas já pré fabricadas é possível encontrar uma grande variedade de adsorventes comerciais para fins cromatográficos. Os adsorventes mais comuns em CCD são:<sup>25</sup>

- ❖ Alumina: (é geralmente aplicada na separação de compostos lipofílicos e pode ser preparada com características ácidas, neutras e alcalinas, podendo assim ser aplicada na separação de substâncias que apresentem variações dessas características)
- ❖ Celulose: Quando se utiliza a celulose em CCD a finalidade é que ela funcione como suporte da FE líquida em uma cromatografia de partição ou troca iônica e é comumente empregada na separação de proteínas e nucleotídeos.
- ❖ Poliamida: Existem dois tipos de poliamida para aplicação em cromatografia, a poliamida 11 e a 6. O que vai diferenciar a aplicação de cada uma é o tipo de adsorvato que deseja separar (geralmente fenóis e ácidos carboxílicos). O processo de separação nessa matriz consiste na competição pela formação de ligações de hidrogênio entre o adsorvente e a FM.

## ❖ Sílica

Em CCD a sílica gel é o adsorvente mais utilizado como FE.

A denominação Sílica é comumente utilizada para abreviar o termo dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), que pode se apresentar na forma cristalina ou amorfa, hidratada ou hidroxilada (também chamada de silanol, siloxanol ou silicol). A sílica gel é um tipo  $\text{SiO}_2$  amorfa que apresenta uma estrutura muito porosa, caráter fracamente ácido e que, antigamente, era obtida pela acidificação de soluções aquosas de silicato de sódio, seguida da lavagem (e posterior secagem) do precipitado gerado.<sup>25</sup>

Esse processo mudou e, atualmente, a  $\text{SiO}_2$  passou a ser preparada através do processo sol-gel, empregando o tetraetoxisilano como fonte de  $\text{SiO}_2$ .<sup>73</sup> Isso possibilitou a obtenção de dióxido de silício altamente puros, livres de contaminantes como metais  $\text{M}^{3+}$  e outros. Espécies contaminantes quando presentes na matriz de sílica aumenta consideravelmente a acidez dos grupos silanóis ( $\text{Si} - \text{OH}$ ), podendo ocorrer, como consequência, fenômenos de quimiossorção de bases ou reações ácido-catalisadas das amostras, influenciando assim, o resultado das separações.<sup>25</sup>

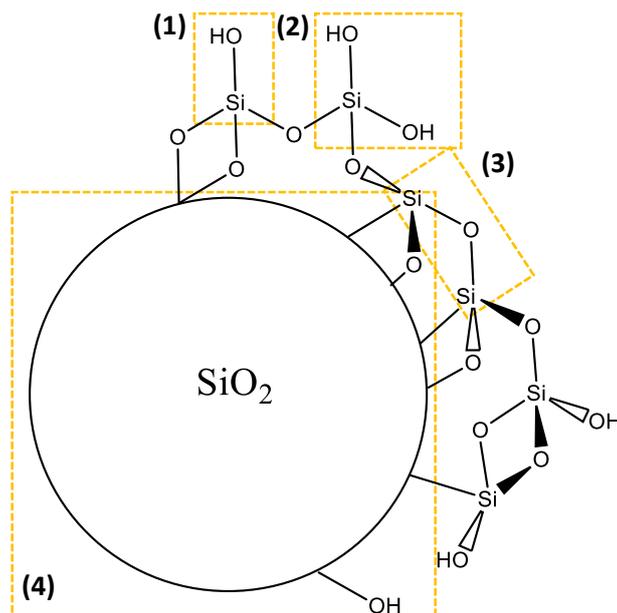
Portanto, a obtenção de  $\text{SiO}_2$  livre de interferentes melhorou significativamente as separações cromatográficas, aumentando a eficiência, estabilidade e reprodutibilidade das FE.<sup>74</sup> Devido a maior disponibilidade comercial e possibilidade de diversas modificações em sua superfície, a sílica se tornou o principal material utilizado em técnicas de separação e purificação de substâncias.

Estruturalmente a matriz de sílica é formada por grupos  $\text{SiO}_4$  que assumem a geometria tetraédrica e que estão distribuídos aleatoriamente formando 2 tipos de redes: uma rede mais externa, com ligações entre os grupamentos da superfície, e outra rede mais interna, formada pelas ligações entre os grãos de  $\text{SiO}_2$ .

Na superfície dos grãos estão presentes os grupos silanóis, vicinais ( $\text{Si} - \text{OH}$ ) e geminais ( $\text{HO} - \text{Si} - \text{OH}$ ), e são estes os grupos que permitem a modificação química da matriz. Os grupos  $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$  estão no interior dos grãos de sílica gel, unidos por pontes de siloxanos como mostra a

Figura 4.<sup>57</sup> Devido a presença de muitos grupos  $-\text{OH}$  na superfície, a  $\text{SiO}_2$  é altamente higroscópica e se liga facilmente a moléculas de água.

Quando a sílica absorve  $\text{H}_2\text{O}$ , ocorre o processo de desativação da sílica, ou seja, os sítios de ligação ficam desativados pelas moléculas de água, assim, é muito importante a ativação dos grupos silanóis (das placas) antes do uso, que consiste na eliminação das moléculas de água da superfície da sílica gel através de aquecimento.<sup>5</sup>



**Figura 4.** Estrutura da sílica gel com a representação da superfície, destacados os grupos: silanol vicinal ( $\text{Si}-\text{OH}$ ) em (1), silanol geminal ( $\text{HO}-\text{Si}-\text{OH}$ ) em (2) e siloxano ( $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ ) em (3). Os grupos siloxanos também estão presentes no interior dos grãos da matriz de sílica, destacado em (4).

Outra propriedade inerente à sílica é que ela não possui a capacidade de agregar-se, assim, para aumentar a aderência do adsorvente ao suporte é comum utilizar um agente aglutinante como: sulfato de cálcio hemi-hidratado e amido.<sup>25</sup> Atualmente a  $\text{SiO}_2$  pode ser obtida comercialmente com o agente aglutinante presente em sua composição, como é o caso das sílicas 60G e 60P e que também podem vir incorporadas com indicador ultravioleta (UV) que é utilizado para auxiliar na visualização de bandas incolores. A sílica com  $\text{F}_{254}$  (ortossilicato de zinco) possui um composto fluorescente que absorve a luz em 254 nm e emite no espectro visível.<sup>54</sup>

Esse tipo de sílica, com indicador, tem ampla aplicabilidade pois muitos compostos também absorvem a radiação em 254 nm assim, a porção de sílica que não possui nenhuma substância, absorve a luz UV em 254 nm e fluoresce, mas quando existe algum composto ligado a sílica, este absorve a radiação e impede que uma parte da luz UV alcance a placa, causando fluorescência reduzida onde o composto está localizado, formando bandas escuras que permitem a visualização das bandas separadas pela cromatografia. Caso os compostos separados não absorvam em 254 nm (mesmo que fracamente), também é possível revelar as bandas por outros métodos disponíveis.<sup>55</sup>

Em CCD a sílica é empregada, usualmente, na separação de compostos orgânicos como: aldeídos, cetonas, fenóis, alcalóides, terpenóides, esteroides, ácidos graxos e aminoácidos.

Como citado anteriormente, as placas cromatográficas podem ser fabricadas pelo próprio usuário ou adquiridas comercialmente. A Figura 5 mostra alguns exemplos destas plataformas.



**Figura 5.** Exemplos de placas comerciais (a esquerda) e placas fabricadas em laboratório (a direita), nesta imagem as placas estão secando em estufa, após o procedimento de espalhamento da suspensão de sílica. **Fonte:** placa comercial Macherey-Nagel

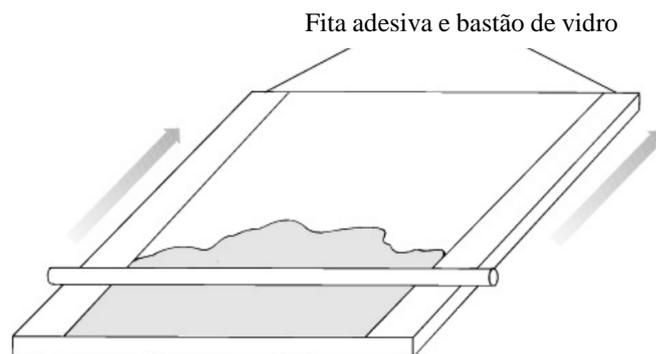
As placas comerciais dispensam a fase de preparação e são bem mais uniformes e homogêneas, o que torna as separações mais reprodutíveis. A camada de adsorvente está depositada sobre uma lâmina de alumínio, plástico ou vidro com a espessura da camada variando entre 0,1 a 2,0 mm. Contudo, essas placas apresentam um custo muito maior quando comparadas as placas fabricadas manualmente.

Quando se opta por fabricar as placas, três etapas são necessárias: A aplicação da suspensão do adsorvente sobre a superfície do suporte escolhido, seguida pelo espalhamento dessa suspensão por toda a área do suporte para formar uma camada homogênea da FE, e por fim, a secagem para ativar o adsorvente. Essas etapas requerem, muita acurácia na execução, utilização de espalhadores comerciais, nivelamento da superfície rígida, procedimentos para evitar a formação de bolhas, rachaduras, e ainda assim, encontra-se dificuldades em obter superfícies uniformes e reprodutíveis.<sup>29</sup>

Existem 4 métodos que podem ser utilizados para revestir o suporte com uma fina camada de adsorvente que são: a) Derramamento b) Espalhamento c) Imersão d) Pulverização.<sup>56</sup>

A técnica mais utilizada é o espalhamento, devido sua praticidade, e produção de placas mais reprodutíveis. Nesta, a suspensão do adsorvente é despejada e espalhada sobre a superfície do suporte, com o auxílio de um bastão de vidro, espalhador manual ou espalhador automático como pode ser observado na Figura 6. Uma placa mais homogênea

e reprodutível é obtida ao se utilizar um espalhador automático, contudo, a aquisição deste dispositivo confere maior custo ao final da produção da placa.



**Figura 6.** Espalhamento da suspensão do adsorvente com o auxílio de um bastão de vidro.

**Fonte:** Química Orgânica Experimental – Técnicas de Pequena Escala

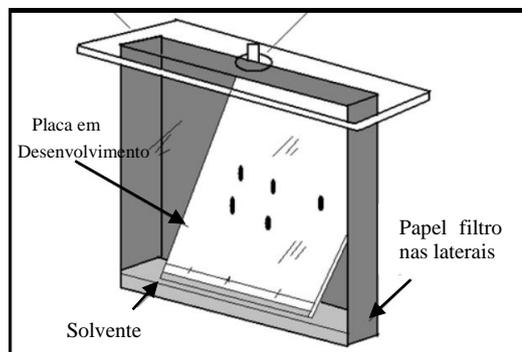
A escolha da FM é de fundamental importância na separação das misturas. Nessa seleção deve-se considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da FM, isso porque há uma competição entre as moléculas da FM e dos componentes da amostra pela superfície da FE. O analista pode se basear na série eluotrópica dos solventes para definir a FM e, quando o solvente puro não realizar uma boa separação, uma mistura de solventes pode ser proposta de modo a melhorar a separação.<sup>32</sup>

O desenvolvimento da corrida cromatográfica em CCD pode ser unidimensional ou bidimensional. Essas variações visam melhorar a separação das substâncias das amostras. Os métodos disponíveis para o desenvolvimento das corridas são: ascendente, descendente, horizontal, circular, múltiplo e desenvolvimento automatizado.<sup>57</sup> Em CCD, o método mais utilizado é a cromatografia ascendente.

Experimentalmente, a FM é colocada em uma cuba cromatográfica de modo a cobrir o fundo do recipiente até uma altura que seja inferior àquela onde foram aplicadas as soluções nas placas (aproximadamente 0,5 cm). Para que se obtenha melhores resultados na separação, é necessário que a cuba esteja saturada com vapores da FM, assim as laterais internas da cuba podem ser recobertas com papel filtro molhado com o eluente.

As placas são colocadas na cuba na posição vertical levemente inclinadas, e devido a ação da capilaridade, que transporta a FM através das camadas. Estas forças fracas surgem da diminuição da energia livre do solvente quando ele entra na estrutura porosa da camada, fazendo com que a FM rapidamente atinja a base da placa e a eluição se inicia, até que o eluente alcance a parte superior da placa.<sup>58</sup>

Ao ascender, a FM arrastará com maior facilidade os compostos menos adsorvidos na FE, separando-os dos compostos mais adsorvidos que ficaram retidos na FE. Quando a frente do solvente estiver a aproximadamente 0,5 cm da extremidade superior da placa, esta deverá ser retirada (marca-se a frente do solvente) seca e revelada.<sup>59</sup> A Figura 7 ilustra o procedimento de desenvolvimento cromatográfico.



**Figura 7.** Procedimento de desenvolvimento cromatográfico em CCD

Para a visualização das substâncias que foram separadas é necessário realizar o procedimento de revelação, que pode ser obtida por meio de métodos físicos (revelação por luz UV), químicos (reveladores cromogênicos) ou biológicos (enzimas e bactérias).<sup>55</sup> Na revelação por método químicos, é necessário que as placas sejam expostas aos agentes cromogênicos (vapores ou soluções) ou borrifados sobre a placa cromatográfica. As desvantagens no uso de reveladores são: trata-se de uma técnica destrutiva (não é possível recuperar a amostra após a análise), não há um revelador universal, reveladores enérgicos só podem ser aplicados quando o suporte da FE é vidro.<sup>25</sup>

A visualização da placa sob luz ultravioleta deve ser realizada sempre que haja essa possibilidade. Como a maioria dos compostos não são modificados pela rápida exposição à radiação ultravioleta, esta técnica é considerada não destrutiva, podendo a amostra ser recuperada assim como na cromatografia preparativa.<sup>60</sup>

Devido o comprimento de onda da lâmpada ser nocivo ao analista/observador e haver necessidade de um ambiente com iluminação uniforme para a visualização das bandas cromatográficas, faz-se necessário o uso de uma câmara escura para análise UV. Existem muitos modelos de câmaras disponíveis no mercado, contudo por mais simples que esta seja, o custo de aquisição de uma unidade pode se tornar um empecilho em laboratórios com recursos reduzidos. Assim, a alternativa de confeccionar uma câmara escura UV permite que a técnica de CCD se torne ainda mais acessível.<sup>60</sup>

Com o advento da cromatografia líquida de alta eficiência e seus diversos atributos observou-se uma preferência por esta abordagem sobre a CCD. No entanto Poole <sup>39</sup> considera que essas técnicas devem ser vistas como complementares, e que devem ser distinguidas pelas suas diferentes propriedades.<sup>61</sup>

A apreciação limitada das funcionalidades da CCD e a ausência de equipamentos para realização das operações unitárias que independam do usuário faz com que a CCD seja frequentemente negligenciada e imperceptível para muitos cientistas experientes.

Com o intuito de aprimorar a técnica e conseqüentemente, aumentar o reconhecido e seu uso geral Poole <sup>39</sup> vislumbra a necessidade de alguns avanços nas principais tecnologias, que são: Controle externo da vazão da FM, integração da plataforma instrumental, detecção contínua on-line ou análise de imagem.<sup>62</sup> A ausência desse desenvolvimento tecnológico mantém a CCD no patamar de técnicas meramente qualitativas.<sup>63,20</sup>

Um dos avanços mais importantes para a CCD está no uso de estratégias que permitam a detecção das substâncias separadas, possibilitando a execução de ensaios semi-quantitativos e quantitativos. Essas estratégias podem ser divididas em duas categorias: direta (*in situ*) e indireta.<sup>8</sup> Na primeira, a detecção é feita diretamente na cromatoplaça sem necessidade de isolamento da banda cromatográfica para a análise, caracterizando-a como técnica não destrutiva. Na segunda, as regiões da cromatoplaça que contém as bandas cromatográficas são removidas e analisadas por alguma técnica instrumental, o que a caracteriza como um procedimento destrutivo.<sup>7</sup>

Vale destacar que as técnicas indiretas aumentam o número de procedimentos necessários a realização das medidas o que pode acarretar em um aumento das possibilidades de erro. Nesse sentido, atualmente, as técnicas indiretas têm sido pouco utilizadas e, portanto, não serão discutidas neste trabalho.

Os sistemas comerciais para detecção direta podem ser dos tipos: densitômetros óptico de varredura (que consiste em determinar a área e a intensidade da banda), scanners de matriz de diodos e analisadores de imagem (câmeras de dispositivos com carga acoplada e scanners de mesa). A avaliação por espectroscopia (espectrometria de massas <sup>64</sup>, espectroscopia no infravermelho <sup>65</sup> e Raman <sup>66</sup>) também são possíveis.<sup>57</sup>

O método mais utilizado para a quantificação direta é a densitometria óptica de varredura, que consiste em determinar a área e a intensidade da banda através da varredura das bandas contidas na placa, medindo a reflexão da radiação que pode estar relacionada com os fenômenos de absorção ou fluorescência. Esse processo gera densitogramas com

uma série de picos que serão interpretados com o auxílio de um modelo matemático que permite gerar curvas de calibrações para quantificação de substâncias de interesse, seja por área ou altura do pico.<sup>67,68</sup>

A densitometria de varredura é o método dominante para interpretação e quantificação em CCD<sup>69</sup> mas que, aparentemente, atingiu a estabilidade na sua evolução. O método de detecção está limitado a medidas de reflexão no modo absorvância ou fluorescência na faixa de 190 – 900 nm (UV-VIS), necessita da aplicação de abordagens quimiométricas modernas para análise de dados. Enquanto a densitometria de varredura permanece estagnada, grandes melhorias foram e são conseguidas através da análise por imagens, também conhecida como densitometria de vídeo.<sup>39</sup>

Com a revolução digital iniciada no século XX, houve uma transformação na indústria, na economia, na ciência e na sociedade. O desenvolvimento de câmeras digitais, permitiu a sua aplicação em diversas áreas e em muitas técnicas analíticas, inclusive em cromatografia planar, isso porque, a detecção se tornou mais simples e menos dispendiosa quando comparado aos densitômetros clássicos. Assim a avaliação densitométrica por imagens digitais das placas de CCD e do papel em CP tornou-se predominante.<sup>11</sup>

## **5. ANÁLISES QUÍMICAS POR IMAGENS DIGITAIS**

Imagens digitais têm sido utilizadas como fonte de informação analítica desde o século passado com os primeiros registros datados na década de 1960. Ledley em 1964 descreveu a utilização de um scanner rudimentar para converter exames médicos em dados digitais, que serviram como base para diagnósticos mais rápidos e precisos.<sup>70</sup>

Da década de 1960 até os dias atuais o uso de imagens digitais cresceu rapidamente, com aplicação nas mais diversas áreas que utilizam rotineiramente técnicas de processamento digital de imagens. Muitos exemplos podem ser citados como o uso de imagens radiográficas na medicina,<sup>71</sup> técnicas para imageamento celular nas ciências biológicas,<sup>72</sup> estudos de padrões de poluição a partir de imagens de satélites na geografia,<sup>73</sup> processamento de imagens degradadas de artefatos raros que não podem ser recuperados na arqueologia.

Em 1970 Anuta<sup>74</sup> descreve pela primeira vez a utilização de imagens digitais diretamente em Química Analítica ao desenvolver um sistema para registro espacial de imagens multiespectrais e multi temporais digitalizadas. Com o avanço da tecnologia e o desenvolvimento de computadores, câmeras e softwares cada vez mais eficientes para

obtenção de dados, houve um crescimento exponencial no uso de imagens digitais para fins analíticos.

### ***5.1 Propriedades das imagens digitais***

Atualmente há diversos tipos de aparelhos disponíveis para a obtenção de imagens digitais, desde os mais simples e compactos como câmeras digitais, scanners, *webcams*, smartphones, a equipamentos maiores e sofisticados tais como satélites, tomógrafos, aparelhos de radiografia, microscópios entre outros.<sup>75</sup>

Basicamente, as imagens digitais são divididas em dois grupos: vetorial e raster. Imagens vetoriais são aquelas produzidas por figuras geométricas, gráficos, desenhos e são comumente utilizadas em softwares de desenhos técnicos e engenharia. Contudo, a dependência de dispositivos para a interpretação das imagens vetoriais dificultou seu uso, assim essa tecnologia perdeu espaço para as imagens do tipo raster.<sup>76</sup>

Imagens digitais do tipo raster, ou *bitmap* (*do inglês, mapa de bits*), ou ainda matriciais, são aquelas que apresentam como menor unidade de composição o pixel. A imagem é o resultado de um conjunto finito de pixels definidos por valores numéricos, formando uma matriz matemática ou malha de pontos. Devido a praticidade tecnológica, imagens raster são utilizadas em todos os tipos de equipamentos de fotografia e imagem disponíveis no mercado.<sup>77</sup>

Imagens digitais raster, são imagens binárias, também chamadas de *bi-nível*, representadas por uma função bidimensional  $f(x, y)$  em que  $x$  e  $y$  são coordenadas espaciais e a amplitude de  $f$ , representada pelo par de coordenadas  $x, y$  em qualquer ponto do eixo cartesiano, é chamada de intensidade ou nível de cinza da imagem nesse ponto. Essa função bidimensional também é representada por uma matriz numérica que utiliza números binários (0 ou 1) e cada elemento dessa matriz representa um elemento da imagem, elemento pictórico ou pixel. Os números binários são codificados de modo a permitir seu armazenamento, transferência, impressão ou reprodução, e seu processamento por meios eletrônicos.<sup>78</sup>

Cada pixel pode assumir uma única cor que varia do branco (soma de todas as cores) ao preto (ausência total de cor) passando por todo o espectro visível. Profundidade de cor é um termo que descreve a quantidade de bits usados para representar a cor de um único pixel. Quanto maior o número de bits por pixel na imagem maior será a escala de cores disponível para composição da imagem.<sup>79</sup>

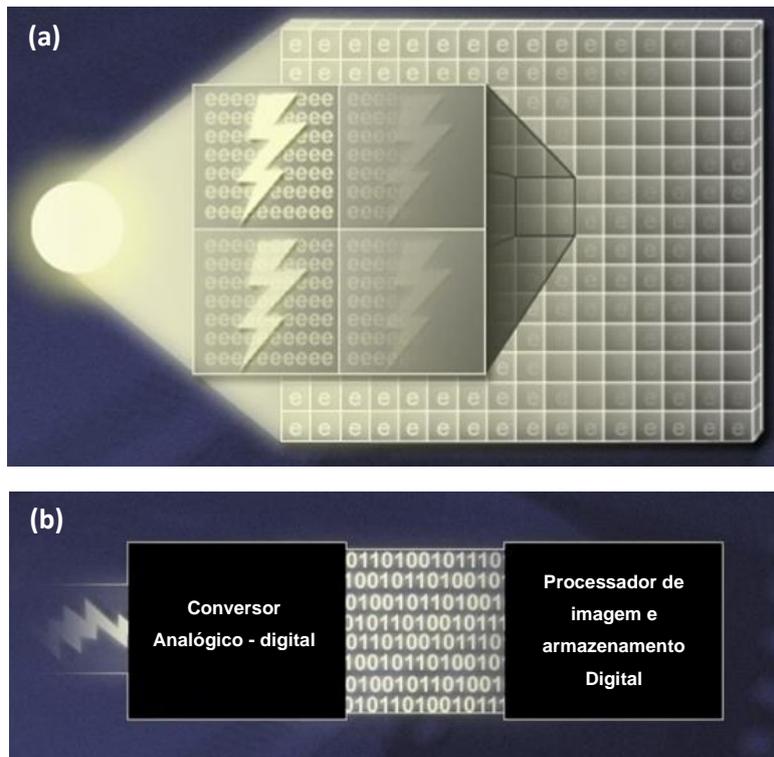
Uma imagem que possui intensidade de cor de apenas um bit terá somente uma cor, que pode ser o branco ou o preto (0 ou 1 do código binário) enquanto outra imagem com profundidade de bits igual a 8, tem  $2^8$  ou 256 valores (tonalidades) possíveis. As imagens no modo tons de cinza com profundidade igual a 8 têm 256 valores de cinza possíveis.<sup>80</sup> Além da quantidade de pixel de uma figura, a resolução e a cor são fundamentais para definir a imagem digital.

## ***5.2 Dispositivos de capturas de imagem***

Um sensor de imagem digital mimetiza o funcionamento do olho humano, agindo similarmente a retina, captando a luminosidade das imagens que são projetadas sobre ele continuamente.<sup>75</sup>

O sensor é um chip que pode contar com dezenas de milhões de transdutores fotossensíveis (células fotoelétricas), cada um capaz de converter a energia luminosa de um ponto da imagem em elétrons (carga elétrica) gerando valores diferentes de voltagem e criando um pixel que poderá ser lido ou gravado na forma de valores numéricos que, por meio de um microprocessador passará por um processo de conversão analógico-digital gerando a imagem digitalizada. Quanto maior for a quantidade de luz incidente sobre as células fotoelétricas do sensor de imagem, maior será a quantidade de elétrons gerados.<sup>81</sup>

Em um dispositivo para captura de imagens a forma é projetada, através de uma lente, em uma matriz bidimensional de capacitores organizados em fileiras (circuitos de  $\text{SiO}_2$ ). Cada capacitor é capaz de acumular uma carga proporcional a intensidade da luz incidente sobre si (Figura 8 (a)). Essas células fotoelétricas convertem a luz em carga elétrica e enviam a sequência de voltagem para um processador que constrói a imagem e armazena em algum tipo de mídia<sup>81</sup> como mostra a Figura 8 (b).



**Figura 8.** (a) Matriz de sensores com uma zona ampliada para ilustrar a absorção de luz em. (b) Ilustração de como ocorre a conversão da luz em sinal elétrico, em seguida, a conversão do sinal em imagem e o armazenamento da mídia por meio de um processador. Adaptado google imagens

Basicamente, dois tipos de sensores dominam o mercado digital, o CCD (do inglês *charge coupled device*) e o CMOS (do inglês *complementary metal-oxide semiconductor*).

No sensor CCD o transporte da carga realiza-se de forma vertical e horizontal onde cada capacitor transfere seu conteúdo a seu vizinho (linha vertical) promovendo o acúmulo das cargas, por fim, o último capacitor lança sua carga (linha horizontal) em um amplificador, fora do sensor, que converte este sinal em voltagem. Repetindo esse processo, o circuito converte todo o conteúdo da matriz em uma sequência de voltagens que podem ser digitalizadas e armazenadas. Essa tecnologia foi considerada durante muitos anos superior aos sensores CMOS por apresentarem melhor resolução nos tons e na luminosidade.<sup>75</sup>

Com o avanço tecnológico, os sensores CMOS sobressaíram aos CCDs devido suas inúmeras vantagens, tais como: menor consumo de energia, menor nível de aquecimento, o sistema de escaneamento independente acarreta em menor interferência e ruído na imagem, utilizam menos componentes e elementos eletrônicos em sua fabricação, podendo assim, ser fabricado em tamanhos menores e mais compactos.<sup>82</sup>

Desse modo, sensores CMOS são empregados nas câmeras dos segmentos consumidor, semi-profissional e profissional, comumente utilizados em smartphones, *webcams* e câmeras digitais de bolso.<sup>83</sup>

Diferentemente do CCD, um sensor CMOS é constituído por um circuito interno composto por uma matriz de sensores de pixel, cada sensor contém um fotodetector e um amplificador que funciona de forma independente dos demais, possibilitando a conversão da carga em voltagem e a transformação da informação digital, diretamente, no próprio sensor. Este funcionamento requer um desenho com elevado grau de complexidade.<sup>82</sup>

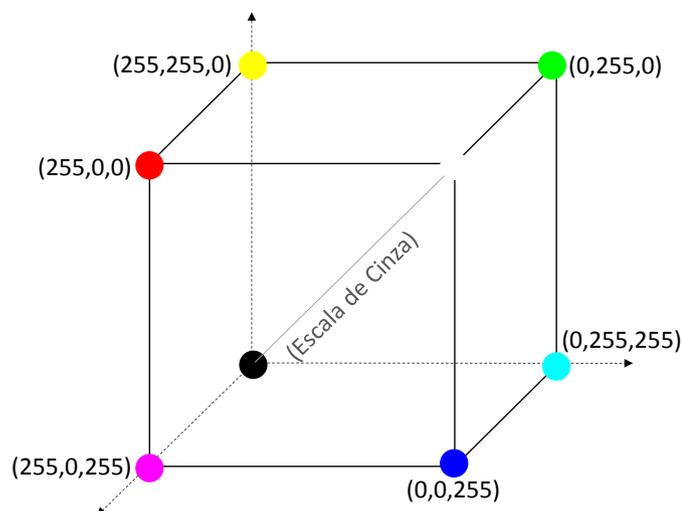
A luz projetada nos sensores CMOS gera um sinal que pode ser interpretado de diversas maneiras digitalmente. Não só quanto à sua intensidade mas também quanto a seus parâmetros de cores. As cores são estímulos visuais fisicamente definidos e podem ser quantificadas, numericamente, usando uma série de modelos (espaços de cores) tais como HSV, HSL, CIE, CIELAB, CMYK e RGB.<sup>16,84</sup>

Um modelo de cores é um modelo matemático que transcreve as cores em números possibilitando a extração de informações relacionadas às cores do objeto em estudo. Assim, utilizando a eletrônica correta e ferramentas de programação é possível converter os sinais em cores e vice-versa.

### **5.3 Modelo de cor RGB**

Dentre os modelos de análise de imagem acima citados, o padrão RGB mimetiza a percepção de cores do olho humano e foi proposto, em 1976, pelo pesquisador Bryce Bayer.<sup>15</sup> Esta representação é conhecida como padrão Bayer ou padrão RGB, que se baseia em um modelo tricromático de discernimento de cores, onde a mistura de cores primárias aditivas, vermelho (do inglês *Red*), verde (do inglês *Green*) azul (do inglês *Blue*) em diferentes combinações/proporções e níveis de intensidade podem simular todas as cores do espectro eletromagnético na região do visível.<sup>16</sup>

Esse método de detecção foi empregado e descrito pela primeira vez, em Química Analítica, por Momeni e colaboradores no final dos anos 1990, que desenvolveram um sistema para detecção quimiluminescente de proteína ligada ao retinol.<sup>85</sup> O modelo de cor RGB é representado geometricamente em um espaço (matriz) tridimensional denominado por cubo de cores (Figura 9).



**Figura 9.** Cubo de cores do modelo RGB

Como ilustrado na Figura 9, nas arestas do cubo têm-se as cores primárias R, G ou B, que numericamente variam de 0 a 255 (8 bits), sendo 0,0,0 a ausência de cor (preto) e 255, 255, 255 a combinação de todas as cores primarias em máxima intensidade (branco).

As faces representam a mistura de duas cores primárias formando assim as cores secundárias, e a diagonal principal denota a escala de cinza. Cada ponto do sistema de coordenadas tridimensional corresponde a uma determinada cor do espectro visível e é composta pela contribuição das cores primárias RGB com intensidades variando de 0-255 (8 bits), ou seja, 256 níveis de cor, assim o número total de cores possíveis será igual a  $256^3$ , cerca de 16,7 milhões de cores.<sup>86</sup>

Com os valores numéricos obtidos pela decomposição das cores, por meio de um software adequado, é possível estabelecer uma correlação, entre a intensidade de cor e informações químicas, através de algoritmos específicos e adquirir um sinal analítico para determinações qualitativas e quantitativas com desempenho adequado.<sup>14,15</sup>

Parte do sucesso da aplicação de imagens digitais em determinações analíticas deve-se a características relevantes desse método, como a diminuição no custo da análise, substituição de equipamentos de custo elevado, portabilidade e simplicidade.<sup>13</sup> O fato do sistema ser de três variáveis, o torna atrativo pela facilidade de interpretação dos resultados em que a variação de cor pode, muitas vezes, estar associado à variação da concentração de uma substância de interesse.<sup>87</sup>

As vantagens da detecção utilizando imagens digitais estimulam sua aplicação em diversas áreas, tais como, detecção em segurança alimentar,<sup>88,17</sup> segurança farmacêutica,<sup>89</sup> testes bioquímicos<sup>90</sup>, teste de qualidade da água,<sup>88</sup> análise de

medicamentos para verificar a presença de adulterantes,<sup>91</sup> diferenciar produtos falsificados<sup>92</sup> e de qualidade inferior de produtos autênticos e ainda na identificação de drogas de abuso, como a cocaína.<sup>93,94</sup>

#### ***5.4 Uso de detecção com imagens digitais em Cromatografia Planar***

Para aplicações em cromatografia planar as imagens são obtidas, usualmente, com scanners, câmeras digitais, e mais recentemente com celulares, sendo imprescindível o controle rigoroso da iluminação da cromatoplaça uma vez que variações na iluminação levam a variações nas cores das imagens e, conseqüentemente, nos resultados analíticos gerados.

Akar e Burnaz<sup>95</sup> propuseram um método de análise colorimétrica alternativa ao método espectrofotométrico (método padrão), que consiste na separação de amostras de extratos vegetais complexados a neocuproína (formando complexos coloridos) por CCD. Após as separações, as placas cromatográficas eram analisadas com o auxílio de um scanner de mesa e um *software* para análise das imagens (ImageJ).

Dawan e colaboradores<sup>96</sup> utilizaram scanner de mesa como detector para análise de dispositivo de CCD acoplado a um microdispositivo de papel para determinação de capsaicinóides totais. Após a separação da amostra por CCD e da reação colorimétrica no microdispositivo, este foi digitalizado por um scanner e as imagens obtidas foram avaliadas quanto ao valor da intensidade em escala de cinza pelo programa ImageJ. O método proposto foi aplicado para determinar os capsaicinóides em amostras de pó seco e temperos em pó e os resultados foram concordantes com os obtidos pelo método HPLC.

Halkina e Sherma<sup>97</sup> desenvolveram um método para determinar cafeína em comprimidos analgésicos e em bebidas do tipo cola utilizando a CCD como método de separação e um scanner de mesa como detector. Após a secagem das placas, scanners de mesa de baixo preço, comercialmente disponíveis na faixa visível, permitiu uma imagem de alta resolução das bandas, obtida após a separação cromatográfica. Nesse trabalho, lâmpadas UV de 254 nm e UV de 366 nm (inclusive filtros) foram feitos sob medida para o scanner de mesa com o intuito de avaliar as placas na faixa de UV ou fluorescência.

Embora os scanners de mesa sejam muito utilizados por fornecerem iluminação uniforme com luz branca, varredura rápida, alta resolução óptica e por produzirem imagens da cromatoplaça que permitem o armazenamento e manipulação da imagem. Eles são limitados à detecção somente na região visível, necessitam de reveladores ou

reações colorimétricas para tornar as bandas visíveis, os métodos validados apresentam altos limites de detecção e os dados de varredura são armazenados como um conjunto de valores RGB que necessita, de softwares para a conversão da imagem armazenada em informações cromatográficas (por exemplo, Sorbfil, JustTLC, Biostep, ImageJ, etc.) e do uso de ferramentas quimiométricas para análise dos dados.<sup>98</sup>

Devido a praticidade, o uso de smartphones e *webcams* no desenvolvimento de sistemas de detecção alternativos cresce exponencialmente.

Shahvar, Saraji e Shamsaei<sup>99</sup> descreveram o emprego de smartphones na detecção quantitativa da morfina por meio de uma resposta quimiluminescente (através da reação entre a morfina e permanganato de potássio) em placas de CCD. Uma câmara escura foi desenvolvida pelo grupo para colocação da placa e aquisição das imagens pelo celular. As imagens foram salvas na memória do telefone e posteriormente analisadas por meio de um aplicativo local (Rang Shenan) para Android.

Utilizando uma câmera digital, Lancaster *et al.*<sup>100</sup> desenvolveram um sistema para varredura em cromatoplasmas que combinam um computador com digitalizador de vídeo e uma fonte de radiação (UV) monocromática apropriada para iluminar e obter a imagem. No procedimento proposto a luz refletida é captada pelo dispositivo de carga acoplada (sensor fotoativo) para formação da imagem que é posteriormente analisada em software apropriado para aquisição das informações analíticas.

Nesse tipo de sistema é possível fazer a detecção no UV, utilizando placas cromatográficas com indicador fluorescente e fontes de radiação específicas, mas ainda assim a interpretação da imagem e conversão desta em uma resposta analítica só é possível com a manipulação da imagem posteriormente à sua captura e não em tempo real, o que torna a análise mais demorada além de exigir pessoal familiarizado com as ferramentas de imagem.

Sereshti e Colaboradores<sup>17</sup> avaliaram a influência da salinidade do solo de diferentes regiões do Irã na qualidade do açafão analisando as amostras por CCD e imagem digital. Nesse trabalho, as amostras foram separadas por CCD e as bandas foram visualizadas sob luz visível e sob luz UV (256nm) e imagens foram obtidas dessas placas.

As imagens obtidas foram então pré-processadas (compressão, inversão, eliminação da linha de base geral (usando mínimos quadrados assimétricos (AsLS)) e, finalmente, convertidas para cromatogramas RGB. A esses cromatogramas, foram aplicadas ferramentas quimiométricas para investigar o efeito de salinidade do solo, como

parâmetro de cultivo, em padrões de TLC de açafião. Este método foi utilizado como uma técnica rápida e simples para obter as impressões químicas das imagens TLC de açafião.

Em outro trabalho, Phattanawasin e colaboradores<sup>101</sup> propuseram um método de análise de imagem de CCD para determinação e quantificação de cloridrato de sibutramina (SH) adulterado em produtos à base de ervas. Para a separação cromatográfica os autores utilizaram placas de sílica 60 F<sub>254</sub> comerciais e reagente de Dragendorff para revelação das bandas cromatográficas.

Para a quantificação de SH por imagem digital os autores<sup>101</sup> digitalizaram a placa em um scanner de escritório e a imagem colorida (JPEG) foi redimensionada, cortada e salva a uma resolução de 40 pixels para análise de imagem do conteúdo SH pelo *software* Sorbfil (*Sorbpolymer*, Rússia). O *software* avaliou cada banda SH individualmente e determinou o *R<sub>f</sub>* e a área do pico de SH e por fim um cromatograma foi gerado. Com base nisso, foi construída uma curva de calibração e calculado o LD da técnica.

A detecção por imagens digitais também está sendo amplamente empregada e avaliada em sistemas, cromatográficos e dispositivos, a base de papel. Li et al.,<sup>102</sup> descreveram o desenvolvimento de um sistema de triagem para tuberculose baseado em aptâmeros ligados a enzimas, suportados em um dispositivo de papel, para a identificação de cepas de micobactérias, por meio de respostas colorimétricas.

As imagens do dispositivo de papel, adquiridas pela câmera de um smartphone (Huawei honra 3C) eram armazenadas no aparelho móvel e, com o auxílio de um aplicativo específico, as informações RGB foram extraídas de imagens digitais, o que permitiu estabelecer um algoritmo com base na relação entre a concentração de *Mycobacterium tuberculosis* e a intensidade da cor dos pontos.

Zhang e colaboradores<sup>103</sup> fabricaram um quimiossensor de papel usando nanopartículas de Pd (para desencadear o reação cromogênica de 5,5'-tetrametilbenzidina na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e testaram um smartphone comum como detector. O uso de um aplicativo de digitalização em cores para obter o sinal analítico também foi necessário nessa proposta.

O que é possível observar nos sistemas descritos na literatura é que, de modo geral, são necessárias várias etapas, após a aquisição da imagem, para se obter os resultados analíticos, tais como:<sup>104,101</sup>

- Compressão de imagem ou redução de tamanho, com o objetivo de atender os requisitos de memória e excluir partes que não apresentam informação analítica;

- Pré-processamento de imagem, em que determinados parâmetros são otimizados de forma a potencializar o sinal analítico.
- Obtenção de dados da imagem, em que as informações de imagem são transformadas em dados matemáticos através de uma série de modelos cromáticos.<sup>101</sup>

A necessidade de processamento digital das imagens cromatográficas e processamentos estatísticos para extrair o máximo de informações dos dados, torna-se uma desvantagem do uso de imagens digitais como forma de detecção, conferindo assim, maior tempo de análise, necessidade de um analista familiarizado com os softwares e ferramentas quimiométricas, fazendo com que a análise e interpretação dos dados não aconteça simultaneamente em tempo real.<sup>17,18,19</sup>

Poole <sup>20</sup> afirma que a possibilidade de gravação espectral é uma característica desejável para aplicações em CCD. Até o presente momento, não foi encontrado na literatura um sistema que permite a obtenção da imagem e aquisição simultânea do sinal analítico, sem a necessidade de processamento da imagem após a sua aquisição.

Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema de detecção baseado em imagens digitais composto por: um software para aquisição de cromatogramas em tempo real, uma câmara de iluminação (UV) controlada e a construção, avaliação e aplicação de placas cromatográficas alternativas para CCD na separação e quantificação de acetaminofeno (ACM), cafeína (CAF) e ácido acetilsalicílico (AAS) em medicamentos.

# **CAPÍTULO 3**

Cromatografia em Papel

## **6. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL COM DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS**

Nesta primeira proposta, desenvolveu-se uma estratégia mais simples de detecção baseada em imagens digitais para análise quantitativa em CP, a qual permitia a aquisição de cromatogramas. Para avaliar a proposta realizou-se a separação e a quantificação dos íons cobre(II) e níquel(II) em amostras de ligas metálicas comparando-se os resultados com aqueles obtidos por espectrometria de absorção atômica em chama.

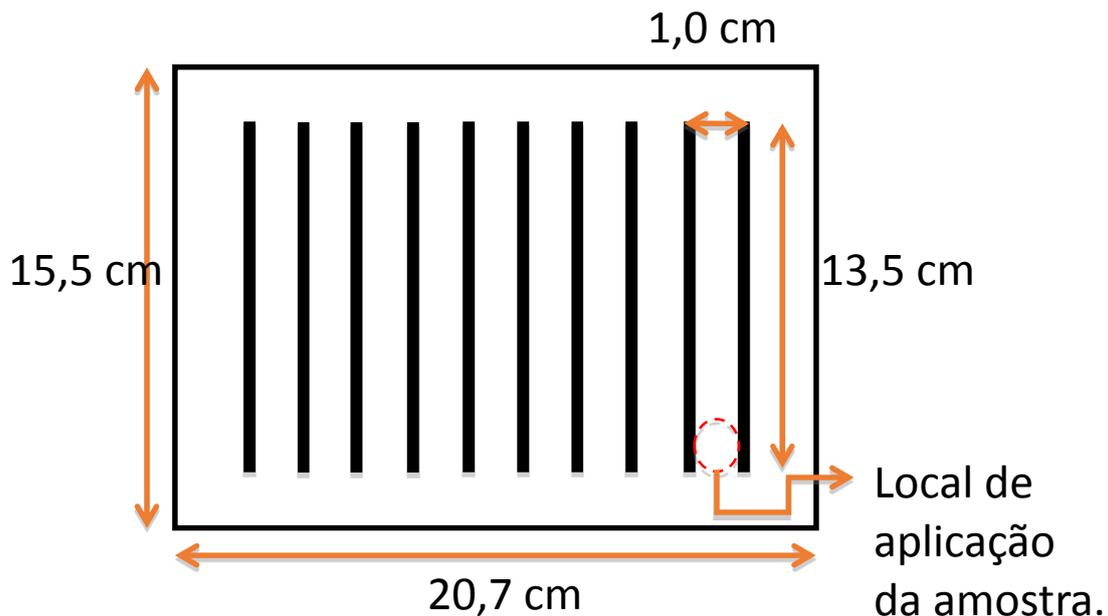
## **7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### ***7.1 Papel cromatográfico empregado***

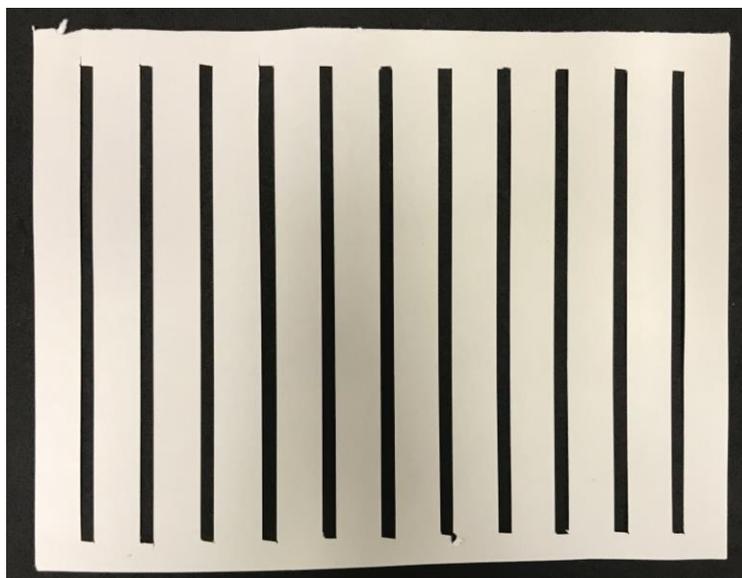
Para o desenvolvimento cromatográfico utilizou-se o papel da marca Whatman, modelo CHR1 Este papel cromatográfico (100 % celulose) possui uma superfície lisa com 0,18 mm de espessura, taxa de fluxo linear (água) de 130 mm / 30 minutos e grande resolução para separações analíticas gerais. Inicialmente, cortou-se as folhas de papel cromatográfico em tamanhos A4 observando-se a direção de manufatura do papel indicada pelo fabricante, com o intuito de manter a uniformidade das fibras para todos os papéis cromatográficos utilizados. Sobre esses papéis foram impressas demarcações que auxiliaram no corte de regiões específicas para a obtenção do chamado papel ranhudo para cromatografia.<sup>105</sup>

Os moldes impressos foram recortados com auxílio de estilete de modo que, foram obtidos 10 canais independentes com 1,0 cm de largura, onde cada uma das soluções dos padrões e/ou amostras foram aplicadas. As dimensões do papel são mostradas na Figura 10. Deve-se destacar que as regiões escuras indicadas na figura são retiradas durante o corte conferindo a independência aos canais. A imagem de um papel devidamente cortado é mostrada na Figura 11.

A aplicação da amostra fora feita à aproximadamente 1,5 cm da base do papel, na entrada de cada canal, possibilitando corridas simultâneas e independentes para cada um dos canais.



**Figura 10.** Esquema de dimensões do papel cromatográfico utilizado.



**Figura 11.** Foto do recorte do papel ranhudo.

### ***7.2 Procedimentos para as corridas cromatográficas***

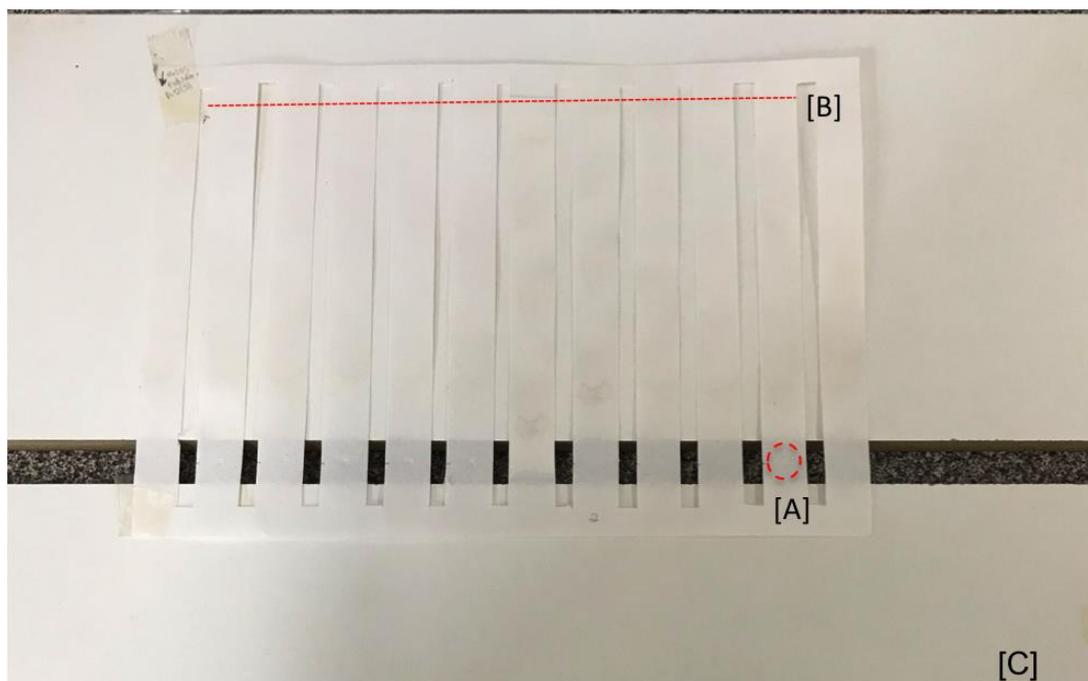
Para a aplicação das soluções das amostras/padrões no papel observou-se a necessidade de não apoiar a região de aplicação sobre uma superfície, uma vez que isso poderia ocasionar na perda de solução que eventualmente atravessasse o papel. Nesse sentido, utilizou-se a estratégia ilustrada na Figura 12, em que a porção do papel que recebe a amostra é suspensa entre dois suportes de madeira evitando o contato dessa

região com a superfície de apoio. Dessa forma, nos estudos realizados, 1,5  $\mu\text{L}$  das soluções eram aplicadas na região indicada na Figura 12 [A] com o auxílio de uma micropipeta.

Após a aplicação, o papel era seco com o auxílio de um secador de cabelos e as extremidades eram unidas de maneira que o mesmo obtivesse um formato cilíndrico (Figura 13) e, então, posicionado em um béquer, de altura suficiente para cobrir todo papel, cujo o fundo continha a solução eluente. Com o início da corrida, o béquer era tampado com uma placa de vidro e aguardava-se a frente do solvente atingir aproximadamente 1 cm do final do papel.

Terminada a corrida, o cilindro de papel era seco ao ambiente e então posicionado em um béquer contendo pequena quantidade de solução concentrada de amônia a fim de neutralizar resquícios de ácido (do eluente) no papel. É importante citar que o papel não entrava em contato com a solução de amônia, apenas com seu vapor.

Por fim, ao retirar do vapor de amônia, o cilindro de papel cromatográfico era aberto e fixado em um suporte para que fosse pulverizado com a solução reveladora de ácido rubeânico e as bandas cromatográficas fossem expostas. Para isso, foi utilizado um nebulizador hospitalar com um bico adaptado (Figura 14) para a geração de um aerossol do revelador, tornando o processo mais eficiente e evitando grandes gastos de volume para esse processo.



**Figura 12.** Suporte para aplicação das amostras onde [A] apresenta o local de aplicação e [B] o local indicado para o término da corrida [C] representa os suportes usados.



**Figura 13.** Papel em formato cilíndrico posicionado no béquer para a realização da corrida.

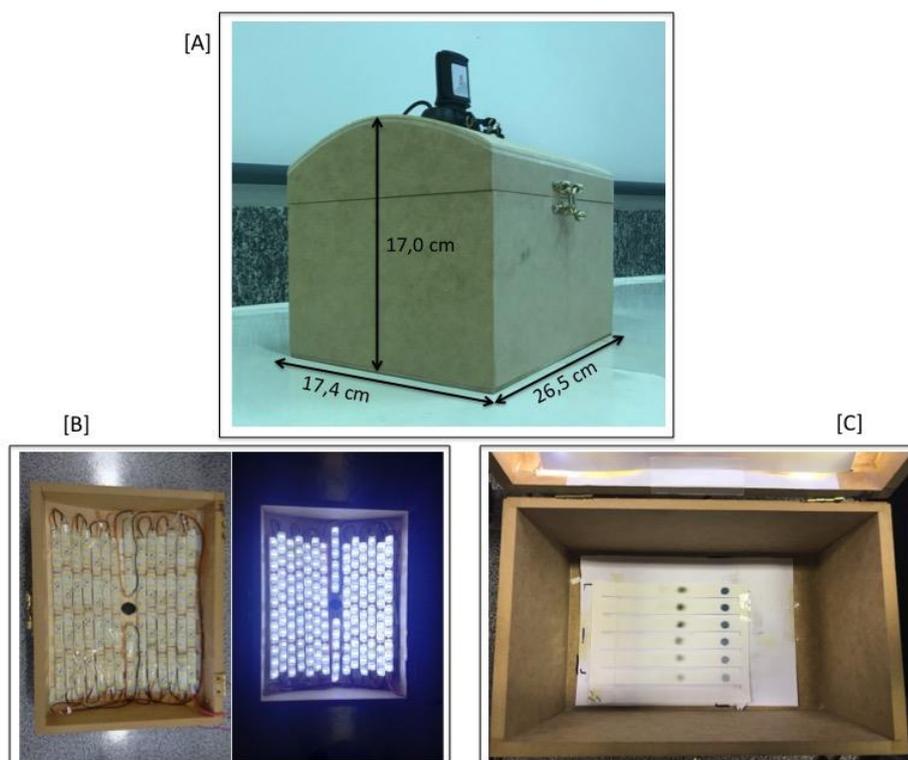


**Figura 14.** Bico adaptado para nebulização da solução reveladora.

### 7.3 Construção do ambiente de iluminação controlada

Para a realização do presente trabalho, foi necessária a construção de um ambiente de luz controlada e uniforme para minimizar as variações nas análises. Esse sistema foi constituído por uma caixa de madeira com tampa abaulada medindo 26,5 cm de comprimento, 17,4 cm de largura e 17,0 cm de altura, considerando a parte mais alta da tampa, como pode ser visto na Figura 15. No interior da tampa, foram fixadas fitas de LED branco, totalizando 168 emissores que posteriormente foram recobertos por um anteparo branco fosco, utilizado para proporcionar um maior espalhamento da radiação. No centro da tampa foi feito um furo com 1,7 cm de diâmetro para posicionamento da *webcam* de alta definição (Logitech c270) e fixadores de elástico foram posicionados para evitar sua movimentação.

Os papéis cromatográficos utilizados, após a revelação, foram posicionados ao fundo da caixa sobre um fundo branco. Para melhor aquisição dos sinais analíticos, procurou-se posicionar o papel cromatográfico de modo que todas as bandas cromatográficas pudessem ser observadas com nitidez. A distância entre a *webcam* e o papel era de 17 cm.



**Figura 15.** Visão geral e dimensões da caixa usada para fazer o ambiente de luz controlada [A]. Parte interna da tampa onde foram posicionados 168 LEDs de luz branca desligados (esquerda) e ligados (direita) [B]. Fundo da caixa onde é posicionado o papel usado para obtenção das medidas [C].

#### 7.4 Programa de análise

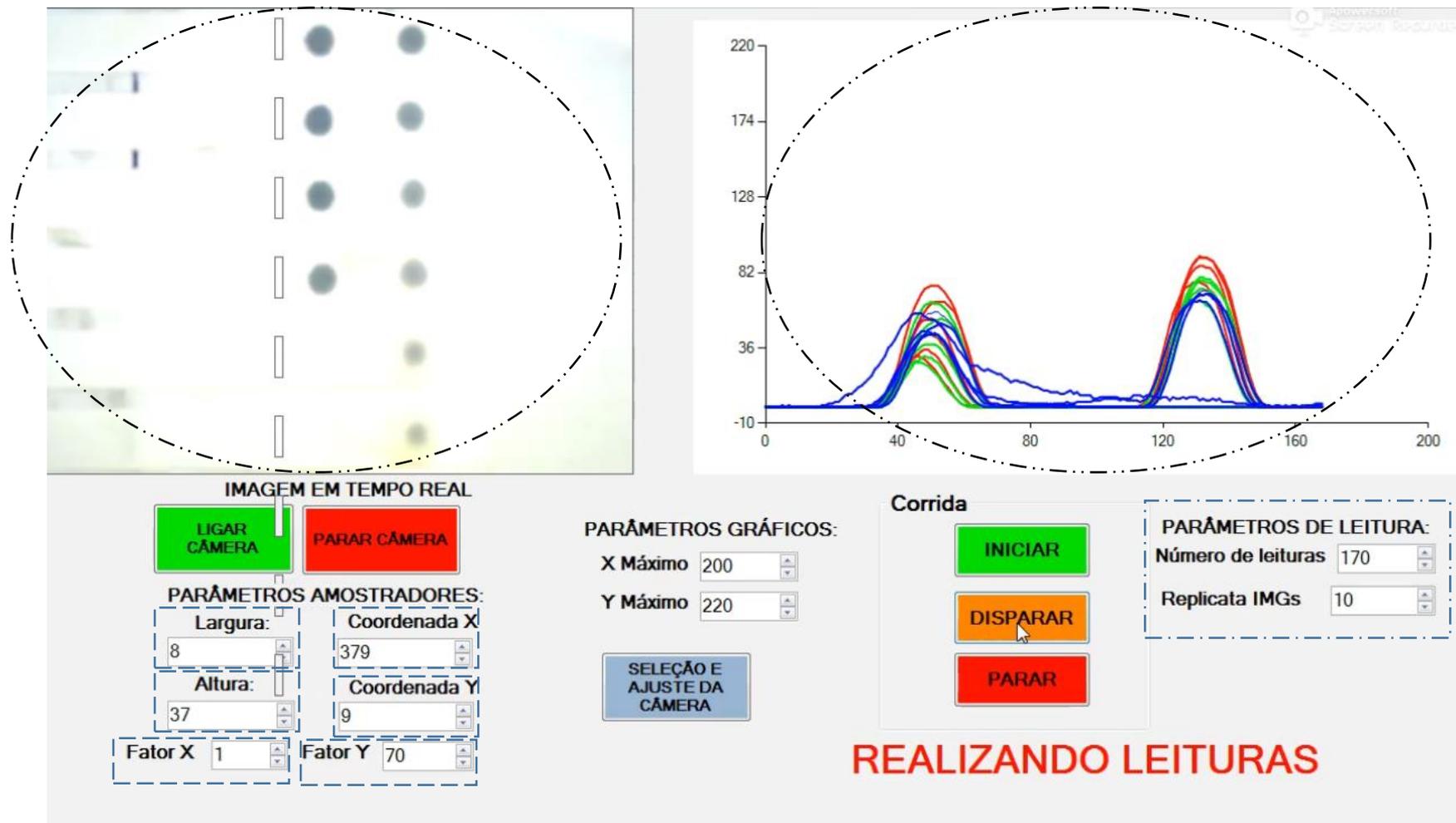
Para a realização das medidas foi desenvolvido um programa que permite a análise de imagens digitais obtidas por uma *webcam* (Logitech c270) em tempo real baseadas no sistema de medidas RGB. O programa foi escrito em *VisualStudio* 2013 e utiliza nove delimitadores de pixels (DP), também chamados de amostradores (Figura 16). Esses delimitadores são retângulos de tamanho variável que definem as regiões da imagem onde serão adquiridos os sinais médios dos pixels contidos no interior de suas delimitações.

Para realizar as medidas, o usuário tem de definir a largura e comprimento dos DP e posicioná-los antes da região onde foram aplicadas as soluções de trabalho sobre os canais cromatográficos. Os ajustes destes parâmetros são feitos na interface do programa, nos boxes mostrados na Figura 16 (1) a (6). Durante as leituras, estes DP se moverão, pixel a pixel, a partir da zona onde foram posicionados, em direção à frente do solvente de eluição e os valores de RGB serão plotados simultaneamente as leituras, gerando vinte e quatro cromatogramas (respostas para R, G e B para cada delimitador e para cada canal).

Para melhorar a relação sinal/ruído, os parâmetros da imagem, tais como brilho, contraste, ganho, exposição, equilíbrio de branco e intensidade da cor podem ser ajustados antes da aquisição de sinal, de modo a que as bandas cromatográficas possam ser observadas com elevada clareza, como mostrado na Figura 16 (A).

Após configurar os parâmetros, ao clicar no botão iniciar, o usuário é solicitado a inserir um nome de arquivo que conterá, ao final das leituras, os dados da corrida e então dar-se-á início a corrida com o deslocado automático dos DP, pixel a pixel, da região direita para a esquerda da imagem sendo obtidos os valores de RGB médio para os pixels contidos no amostrador a cada deslocamento. A distância total percorrida pelos amostradores na imagem é definida pelo chamado número de leituras (Figura 16 (C)) e os cromatogramas obtidos para cada canal e para cada componente de cor (RGB) são apresentados na janela superior direita do programa (Figura 16 (B)), enquanto que, na janela superior esquerda do programa (Figura 16 (A)) o usuário visualiza a imagem de todo o suporte cromatográfico.

Neste trabalho, foram usados valores de 5 pixels para largura dos amostradores e 34 pixels para altura além de 250 leituras para permitir a obtenção dos cromatogramas completos. As coordenadas x e y eram configuradas conforme a necessidade



**Figura 16.** Interface do programa utilizado na obtenção dos cromatogramas onde (A) indica a imagem do papel no ambiente de luz controlada (B) indica a região dos cromatogramas resultantes das leituras. (1) a (6) são os locais de configuração de largura, altura, coordenada x e coordenada y, posição e tamanho dos amostradores respectivamente. As configurações da corrida estão representadas pelos parâmetros de leituras em (C).

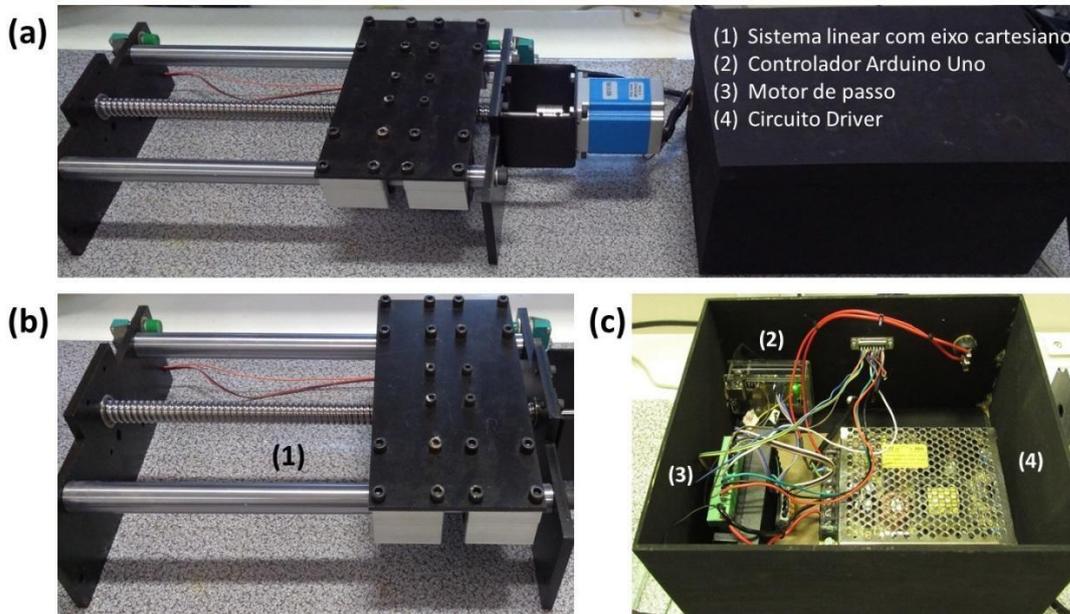
Para as realizações das medidas de cada íon estudado, foi definido um padrão de configuração de imagem que resultasse em um sinal analítico com melhor razão sinal/ruído, a depender da cor do complexo formado com o ácido rubeâmico. Essas mudanças são realizadas ajustando-se as configurações destacadas na Tabela 1 no próprio programa desenvolvido.

**Tabela 1.** Parâmetros de imagem usados nas medidas de amostras de Ni<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.

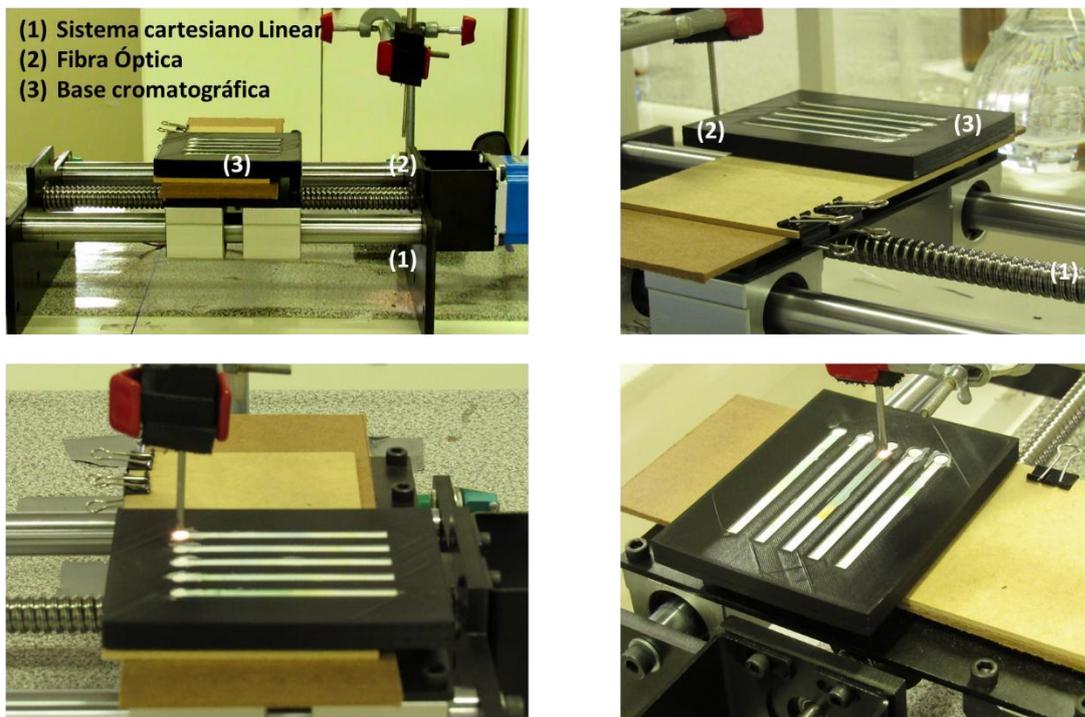
Configurações	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
Exposição	57,1 %	57,1 %
Ganho	17,2 %	21,9 %
Brilho	50,4 %	16,8 %
Contraste	18,8 %	65,6 %
Intensidade de cor	12,5 %	0,0 %
Equilíbrio de branco	34,0 %	40,0 %

## 7.5 Construção de um sistema de detecção por Reflectância na região do visível

Uma outra estratégia para a detecção dos compostos separados por cromatografia em papel foi desenvolvida empregando-se a técnica de reflectância utilizando uma fibra óptica bifurcada. Nas Figura 17 e Figura 18 são mostradas imagens do sistema proposto especificando cada um de seus componentes.

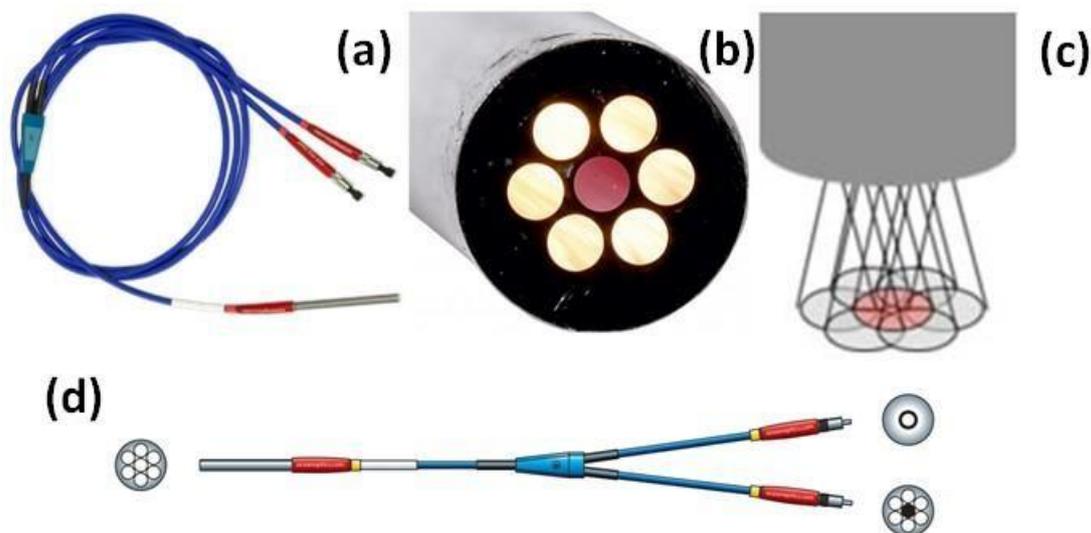


**Figura 17.** Sistema desenvolvido para a movimentação da placa cromatográfica. Visão geral do sistema (a), detalhe da mesa móvel (b) e circuito eletrônico de controle (c).



**Figura 18.** Imagens com detalhes do sistema de detecção por reflectância, para um sistema cromatográfico baseado em camada delgada de sílica.

Nesse sistema, a radiação visível emitida por uma lâmpada de tungstênio (OCEAN OPTICS modelo LS-1) é conduzida até a superfície cromatográfica e a reflexão desta radiação, após a interação com as substâncias, é guiada para um espectrofotômetro (OCEAN OPTICS USB 2000), que realiza a leitura do sinal. Como pode ser visto na Figura 19, a fibra óptica bifurcada utilizada para essa tarefa (OCEAN OPTICS, modelo QR600-7-VIS-125F) possui seis feixes periféricos que conduzem a radiação da fonte até a extremidade da fibra e um feixe central que capta a radiação refletida pelo sistema cromatográfico e 4 mm de diâmetro.



**Figura 19.** Fibra óptica bifurcada, em (a) a fibra completa, em (b) extremidade da fibra responsável pela saída da radiação e absorção da reflexão e em (d) as extremidades da sonda.

Para movimentar a base cromatográfica sob a extremidade da fibra foi empregado um sistema linear com eixo cartesiano equipado com um motor de passo (NEMA23) que permite a movimentação com precisão de décimos de milímetros. Esse sistema foi fabricado sob medida pela empresa TEKKNO mecatrônica<sup>106</sup> e permite um deslocamento linear de até 20 cm, possibilitando a aplicação para fases estacionárias de diferentes comprimentos.

O acionamento do motor de passo que ocasiona a movimentação da base foi realizado a partir de um driver (MS-145-24) e do micro controlador Arduino uno, para o qual foi desenvolvido um programa que possibilitasse ajustar a velocidade, o sentido e a distância de deslocamento da base. Além disso, o programa permite também a comunicação do micro controlador, via RS232, com um computador pessoal facilitando o controle do sistema pelo usuário.

Com o objetivo de controlar o sistema linear e o sistema de detecção espectrofotométrico, a partir de um computador pessoal, foi desenvolvido um programa escrito na linguagem VisualBasic 6.0 para sistema operacional Windows XP.

Nesse programa o usuário define o curso de deslocamento a ser realizado pelo sistema linear assim como a velocidade de deslocamento. Além disso, o usuário deve definir também até 5 faixas de comprimentos de onda que devem ser monitorados durante a realização das leituras, gerando até 5 cromatogramas, um para cada faixa de comprimento de onda, os quais são salvos em um arquivo.txt ao final da corrida.

A Figura 20, mostra a interface ao usuário do programa desenvolvido e suas principais funcionalidades. O programa apresenta três boxes em seu *layout*. As principais funções encontradas em cada box são descritas a seguir.

No box Geral encontra-se os botões de iniciar e parar para obter o Branco. No box Espectros encontram se as opções para definir os parâmetros da análise como, integração e média. No box Iniciar encontra-se os campos, para selecionar as faixas de comprimentos de onda que serão monitorados, e os botões: Iniciar (após clicar em iniciar abrirá uma janela para salvar os dados em local específico), Parar e Injetor (responsável por iniciar a análise)

É importante relatar que para o controle do motor de passo do sistema linear foi utilizado um circuito driver (MS-145-24), o qual recebe comandos de um micro controlador Arduino uno que, por sua vez, realiza comunicação serial (RS232) com o computador pessoal através do programa escrito em VisualBasic 6.0



**Figura 20.** Interface ao usuário do programa desenvolvido em linguagem VisualBasic 6.0

## 7.6 Reagente e soluções

A maioria das soluções utilizadas no trabalho foram preparadas em água destilada. Quando outro solvente foi utilizado há a indicação no texto.

### 7.6.1 Soluções dos íons metálicos

Duas soluções estoques diferentes foram preparadas:

- Uma contendo os íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  na concentração de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a partir da dissolução das massas adequadas dos sais  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, 98%),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haen, 97%),  $\text{Zn}_2\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Isopar, 99%)  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, 98%).
- E outra, para a determinação de íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , contendo estes íons na concentração de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  cada a partir da dissolução da massa adequada dos sais  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, 98%),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haen, 97%).

Para testes iniciais, uma solução padrão contendo os quatro íons metálicos na concentração de  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , cada, foi preparada pela diluição da solução estoque em água.

As soluções padrões para a construção das curvas analíticas utilizadas na cromatografia de papel foram preparados com a diluição da solução estoque para obter concentrações de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , com intervalos de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  entre cada padrão. Essas soluções foram acidificadas com HCl concentrado para que as soluções das curvas ficassem nas mesmas condições das soluções das amostras.

### 7.6.2 Solução eluente

O eluente foi preparado com a mistura de acetato de etila, acetona e ácido clorídrico ( $6 \text{ mol/L}$ ) na proporção em volume de 9:9:2 respectivamente, totalizando os 20 mL usados nas corridas.

### 7.6.3 Solução reveladora

Uma solução de ditioxiâmida (ácido rubeânico) na concentração de 0,1% m/v foi preparada pela dissolução da massa apropriada da substância (Carlo Erba, 90%) em etanol.

### 7.6.4 Preparo da amostra

Como amostras foram usadas três moedas dos anos 1970 compostas por liga cupro-níquel. Tais moedas foram partidas em 3 frações de aproximadamente 220 mg e

cada fração foi dissolvida em solução de água régia  $\text{HNO}_3:\text{HCl}$  (3:1) sob aquecimento. Posteriormente, as soluções foram avolumadas para 50,00 mL com água. Para as corridas cromatográficas, foram realizadas as diluições necessárias das soluções das amostras de forma que as concentrações dos íons atendessem a faixa de concentração estabelecida nas curvas analíticas.

#### *7.6.5 Preparação dos padrões usados na espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)*

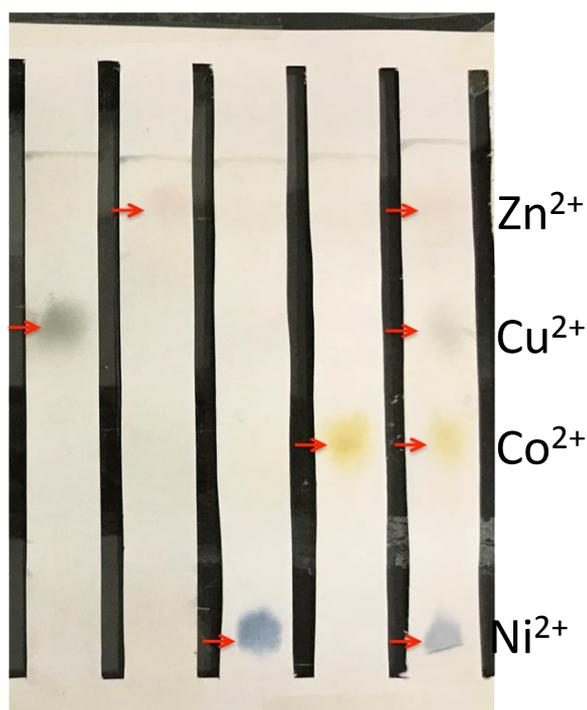
Para as análises comparativas realizadas em FAAS foram preparados padrões mais diluídos de  $\text{Cu}^{2+}$  (1  $\text{mg.L}^{-1}$  a 5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e  $\text{Ni}^{2+}$  (2  $\text{mg.L}^{-1}$  a 10  $\text{mg.L}^{-1}$ ) separadamente. Para as amostras, foram utilizadas diluições suficientes para adequação nas curvas analíticas.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Estudos preliminares com solução mista contendo quatro íons metálicos

Inicialmente foi avaliada a eficiência de separação e de revelação das bandas cromatográficas a partir do procedimento descrito por Vogel,<sup>105</sup> no qual é realizada apenas uma inspeção visual das bandas. Dessa forma, procurou-se realizar a separação dos metais  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  em uma mistura contendo aproximadamente  $0,25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada elemento. Para fins de comparação, foram aplicados também soluções dos íons individuais em canais separados.

As soluções contendo os íons bivalentes previamente citados na seção 7.6.1 foram separadas pelo método proposto por CP, onde, nos primeiros canais foram aplicadas as soluções individuais de  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$ , respectivamente (Figura 21) e no último canal aplicou-se a solução mista de todos os íons. Após a adequação do tamanho do papel para a corrida, obteve-se o resultado ilustrado na abaixo.



**Figura 21.** Parte do papel utilizado na corrida cromatográfica contendo os íons  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$ , além da mistura dos mesmos e bandas cromatográficas explicitadas em cada canal.

Observa-se que nas condições empregadas houve a separação dos íons propostos presentes na mistura, o que pode ser confirmado pelas corridas individuais. Na Figura 21, as setas indicam cada banda relacionada a um íon específico, sendo bem diferenciado por suas cores. A coloração cinza-esverdeada da primeira banda explicitada é característica do cobre, assim como a rosa, a azul e a amarela são específicas para zinco, níquel e

cobalto, respectivamente. Outro aspecto relevante é a aparição das bandas em colorações mais claras no canal destinado à mistura, sendo essa resultante da menor concentração de íons em solução, sendo assim, a quantificação torna-se viável.

É importante ressaltar que não foi possível revelar o  $Zn^{2+}$  com o mesmo revelador usado para os outros íons. Para este íon específico, utilizou-se uma solução diluída de 1,5-difeniltiocarbazona (ditizona) em clorofórmio. Porém, essa revelação não possui duração tão prolongada quanto a realizada para os outros metais que se tornam evidentes com o ácido rubeânico, devido à pouca estabilidade da solução dada pela oxidação a um composto não reativo ou, ao deslocamento do equilíbrio tautomérico ceto-enol para a forma enólica, que produz o ditizonato de zinco que não apresenta a detecção desejável.

Uma vez que os estudos quantitativos para zinco são dificultados devido à instabilidade do produto revelado e, não foram encontradas amostras com quantidades apreciáveis de cobalto, em ligas contendo também níquel e cobre, optou-se por escolher como amostras, ligas de cupro-níquel para a realização das análises.

## ***8.2 Determinação de $Cu^{2+}$ e $Ni^{2+}$ em ligas com detecção por imagens digitais***

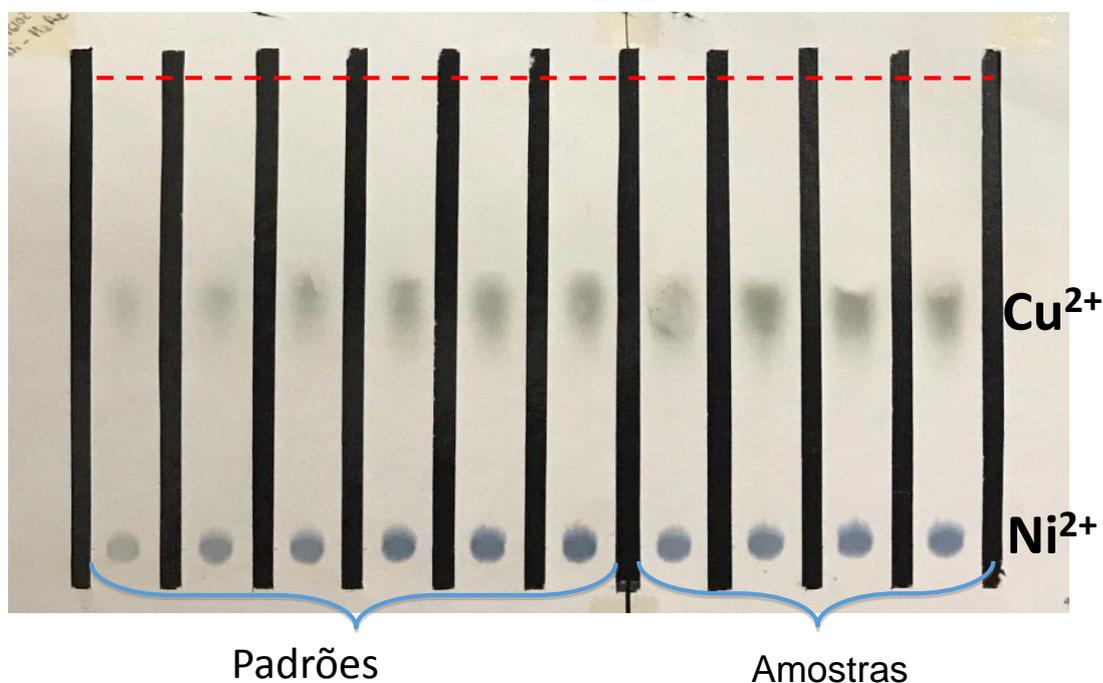
Seguindo os procedimentos descritos na seção 7.2, foram realizadas corridas cromatográficas para a determinação dos íons  $Cu^{2+}$  e  $Ni^{2+}$  nas ligas metálicas de interesse. Para isso, foram utilizados os padrões de  $2\text{ mg.mL}^{-1}$  a  $1,2\text{ mg.mL}^{-1}$  nos seis primeiros canais e, nos quatro canais restantes, foram adicionadas as soluções de amostra, cuja diluição foi realizada de maneira a adequá-las nas concentrações da curva analítica obtida para a CP.

Após os procedimentos, as análises foram realizadas com o auxílio do programa em *VisualStudio* e nele foram adquiridos os cromatogramas que possibilitaram, por meio da altura dos picos, a obtenção das curvas analíticas, além dos sinais para cada amostra.

Para a realização das medidas, foi necessário partir o papel em duas partes, sendo uma constituída de seis canais correspondentes aos padrões e a outra com os outros quatro canais contendo as bandas das amostras. Para evitar erros, os papéis foram posicionados um sobre o outro de modo que as dez bandas de interesse ficassem aparentes e a leitura dos dez canais fosse realizada em uma única medida.

Na Figura 22 é apresentada a imagem do papel cromatográfico revelado após a separação das misturas padrão de  $Cu^{2+}$  e  $Ni^{2+}$  e também para as soluções das amostras.

Observa-se que as bandas referentes a cada íon apresentaram fatores de retenção visualmente reprodutíveis e eficientes, além do escurecimento gradual das bandas cromatográficas com o aumento da concentração dos padrões. Os quatro últimos canais apresentam diluições das soluções de amostra que, no caso da Figura 22, foi diluída para a determinação de  $\text{Ni}^{2+}$ .

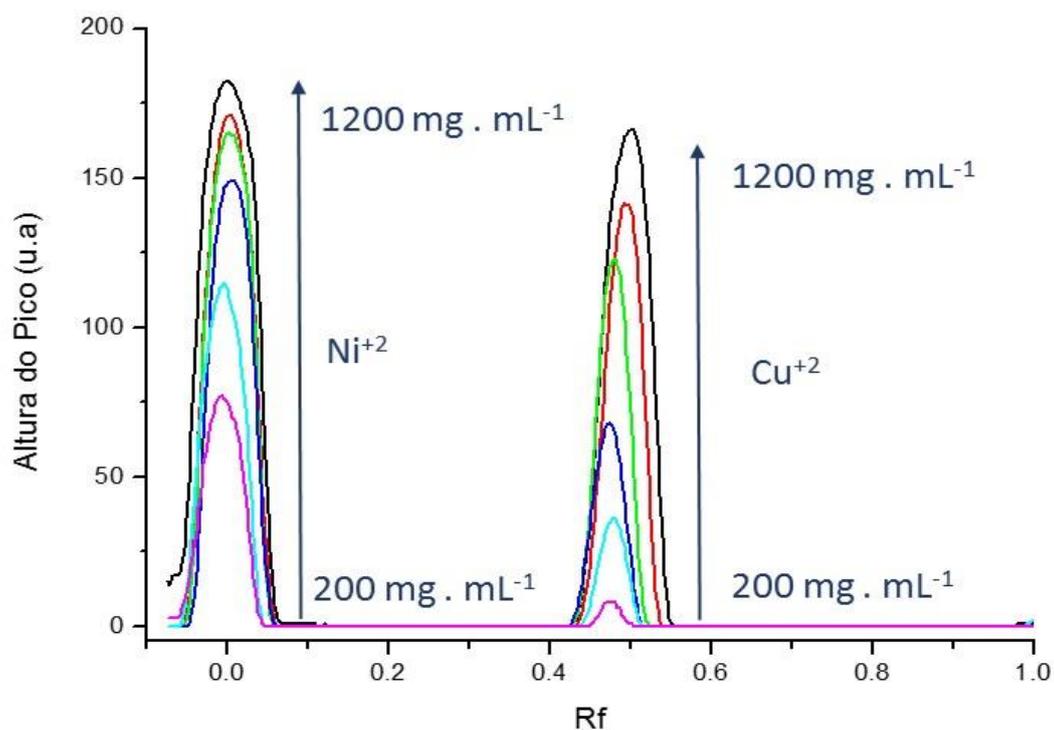


**Figura 22.** Papel de corrida cromatográfica com amostras de  $\text{Ni}^{2+}$  onde os seis canais iniciais apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro canais restantes amostra do íon utilizada e o tracejado apresenta a posição final de corrida do eluente.

Tendo obtido a separação dos dois íons e observado visualmente a variação de intensidade de cores para as diferentes concentrações, procurou-se estabelecer as melhores condições de imagem para a obtenção de sinais RGB que pudessem ser relacionados com as concentrações dos íons.

Como pode ser observado na Figura 22 as bandas referentes ao íon  $\text{Cu}^{2+}$  apresentaram uma coloração cinza-esverdeada, o que acarretou em uma resposta insatisfatória ao se utilizar uma imagem colorida para a aquisição do sinal analítico. Em outras palavras, não foi possível obter uma relação linear dos sinais R, G ou B individuais com a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  quando a imagem era colorida e esse fato pode ser confirmado com a aquisição do espectro de absorvância do  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 25) que demonstra que há uma absorvância significativa do complexo em toda a faixa do espectro visível o que corrobora para que nenhuma resposta específica de R G ou B apresente resultados satisfatórios de forma isolada.

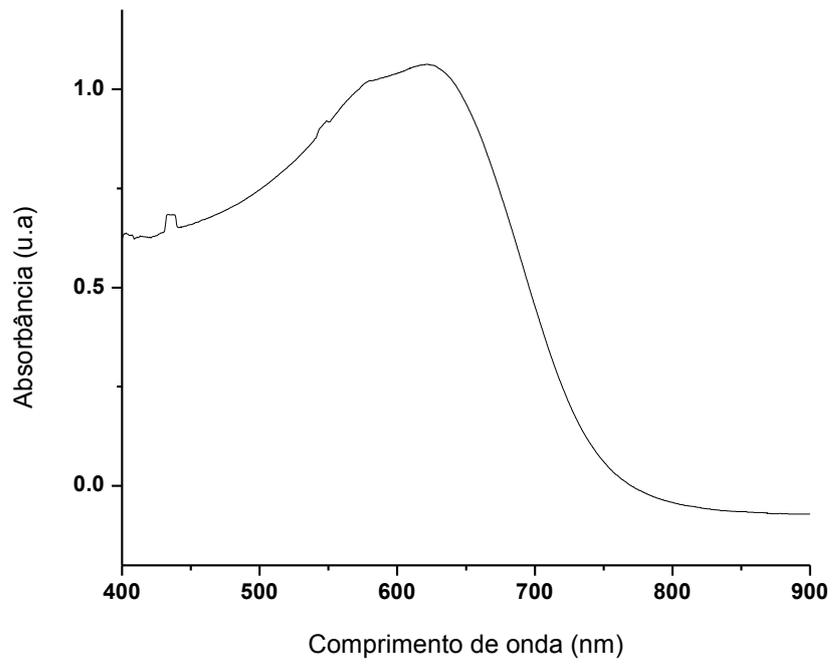
Nesse sentido, optou-se por utilizar uma imagem em escala de cinza, o que proporcionou a obtenção do cromatograma mostrado Figura 23 na qual observa-se o aumento proporcional da altura dos picos referentes aos padrões de cobre com o aumento das concentrações. Nota-se, entretanto, que a resposta em escala de cinza não é linear para os padrões de  $\text{Ni}^{2+}$ .



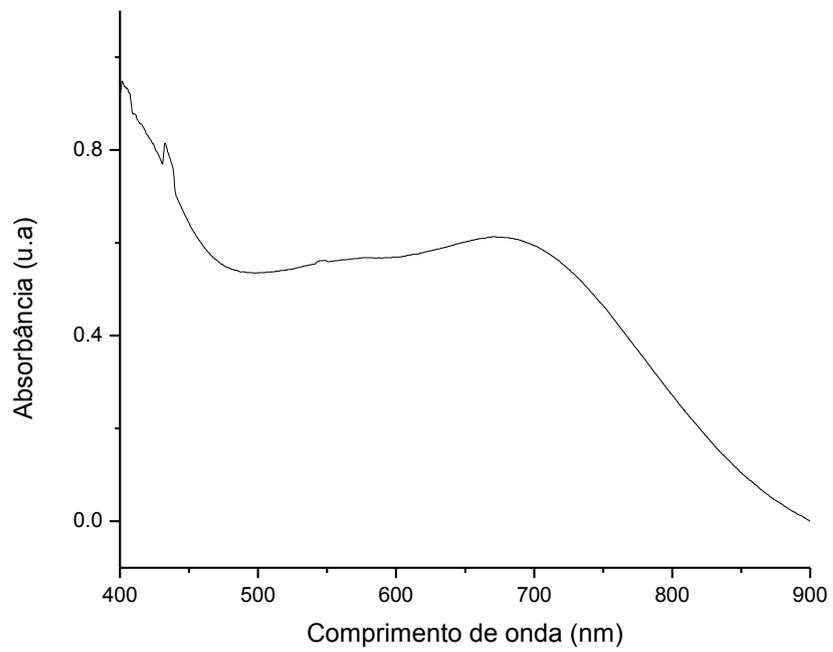
**Figura 23.** Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para o  $\text{Ni}^{2+}$ , observa-se na Figura 22, bandas com coloração azul mais nítidas que aquela obtidas para o cobre, o que permitiu o uso da imagem colorida para a obtenção dos sinais analíticos referentes a esse íon. De fato, a componente R do sistema RGB foi a que proporcionou a melhor resposta linear para as diferentes concentrações de níquel.

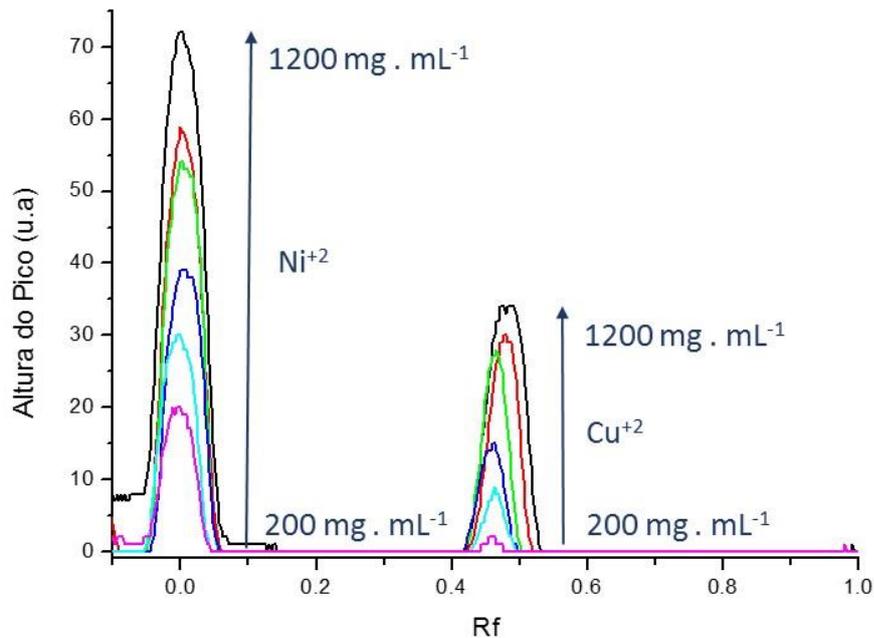
Conforme mostra o espectro da Figura 24, o máximo de absorção para o complexo de níquel se dá em torno de 650 nm, comprimento de onda que corresponde a coloração vermelha no espectro. Esse fato pode ser constatado ao se observar os cromatogramas adquiridos para este íon (Figura 26).



**Figura 24.** Espectro de absorção Ni<sup>2+</sup>.



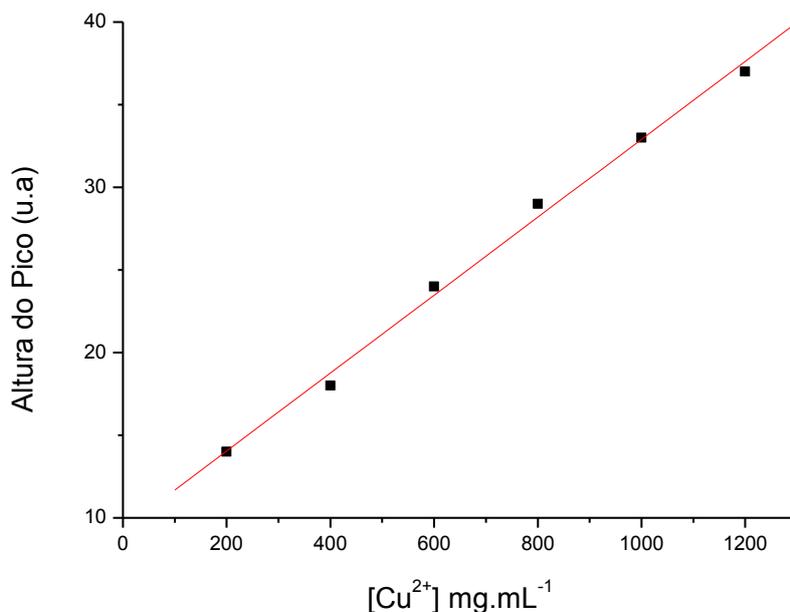
**Figura 25.** Espectro de absorção Cu<sup>2+</sup>.



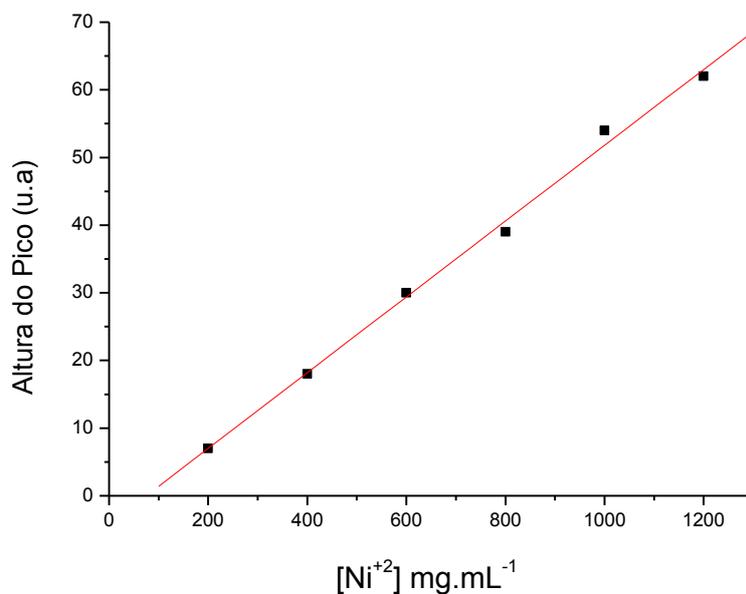
**Figura 26.** Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Outra constatação importante dos cromatogramas obtidos é que o programa desenvolvido possibilitou a aquisição de sinais analíticos com boa razão sinal/ruído para a faixa de concentração estudada, indicando a possibilidade de uso do mesmo para determinações quantitativas.

Baseado nas alturas dos picos obtidos, foi possível construir curvas analíticas com elevadas correlações lineares para os dois íons. Para o íon cobre a curva analítica é apresentada na Figura 27 com  $R = 0,9964$ , sendo estimado um limite de detecção de  $0,93 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para o níquel, a curva analítica com  $R = 0,9982$  e limite de detecção estimado de  $3,53 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  é apresentada na Figura 28. Considerando a simplicidade das medidas, pode-se afirmar que os limites de detecção obtidos são plenamente satisfatórios para a determinação dos íons em ligas metálicas nas quais as concentrações costumam ser relativamente elevadas.



**Figura 27.** Curva analítica obtida para determinação de Cu<sup>2+</sup>.



**Figura 28.** Curva analítica obtida para determinação de Ni<sup>2+</sup>.

Esses resultados indicaram que a metodologia proposta permite obter uma resposta analítica não subjetiva para a determinação quantitativa dos metais. De fato essas medidas são normalmente baseadas na observação visual pelo analista, o que pode levar ao aumento da incerteza nas medidas.

Ainda em relação aos índices de retenção exibidos nas Figura 23 e Figura 26, observa-se que, visualmente, os valores obtidos para os diferentes padrões são muito parecidos. De fato, a média do valor de  $R_f$  para o íon de cobre foi de 0,477 com coeficiente de variação de 2,42 %, o que comprova a boa precisão para esse parâmetro de separação.

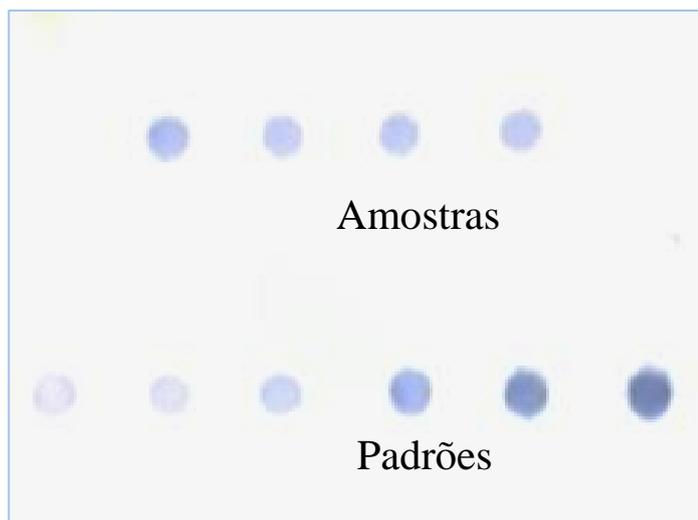
Deve-se destacar que, para o níquel, o  $R_f$  obtido é muito próximo de zero com média e desvio padrão também muito baixos e relacionados a pequenas variações na posição de aplicação, confirmando a precisão com relação ao  $R_f$ .

Já para o cálculo de repetibilidade relacionada aos sinais analíticos obtidos, foi realizada uma medida a partir de uma corrida cromatográfica específica contendo oito canais com o mesmo padrão, sendo adquiridos um valor de coeficiente de variação de 6,56% para as análises de níquel e 6,16% para as respostas obtidas para o íon de cobre. Esses valores mostram que as medidas apresentam uma precisão adequada para a realização de medidas quantitativas, haja vista que o procedimento de análise envolve a aplicação de volumes muito pequenos de amostra (1,5  $\mu$ L) e que a própria exatidão da micropipeta (aprox. 2 %) assim como sua precisão (aprox. 2,1 %) podem causar variações significativas no resultado final. Além disso, é importante destacar que a medida é realizada com uma instrumentação bastante simples, baseada em cromatografia em papel e imagens digitais obtidas por uma *webcam* para aquisição do sinal analítico.

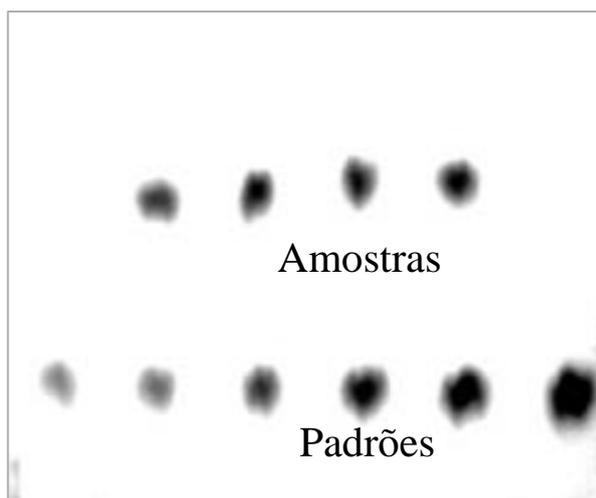
Deve-se relatar também que os resultados descritos acima foram obtidos com base na altura dos picos cromatográficos e não com relação a sua área, o que é comumente empregado em análises cromatográficas. Estudos empregando-se as áreas não levaram a resultados significativamente diferentes daqueles obtidos com base nas alturas dos picos. Dessa forma, optou-se pela altura como parâmetro analítico a ser relacionado com a concentração, uma vez que esse é mais facilmente obtido a partir dos cromatogramas brutos, tornando a análise mais rápida e simples.

### ***8.3 Determinação dos íons de interesse em amostras***

Para a determinação das amostras, usou-se como referência o método de realização das medidas descrito na seção 8.2 obtendo-se as Figura 29 e Figura 30 para determinação de  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  respectivamente. A partir de tais parâmetros, foi possível a obtenção de resultados relacionados ao percentual de cada metal na liga metálica de cupro-níquel estudada, os resultados obtidos em cromatografia de papel foram comparados aos obtidos em espectrometria de absorção atômica em chama e os erros relativos estimados e apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3.



**Figura 29.** Imagem, do papel cromatográfico, obtida pelo programa de análise para a determinação de  $\text{Ni}^{2+}$  em amostras de moedas de cupro-níquel onde os seis primeiros canais (parte inferior) apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro últimos canais (parte superior da imagem) indicam as bandas da amostra em replicatas. Para realizar a leitura em uma única medida foi necessário partir o papel em duas partes e estas foram posicionadas um sobre a outra.



**Figura 30.** Imagem, do papel cromatográfico, obtida pelo programa de análise para a determinação de  $\text{Cu}^{2+}$  em amostras de moedas de cupro-níquel onde os seis primeiros canais (parte inferior) apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro últimos canais (parte superior da imagem) indicam as bandas da amostra em replicatas. Para realizar a leitura em uma única medida foi necessário partir o papel em duas partes e estas foram posicionadas um sobre a outra.

Observa-se que os erros relativos (ER) encontrados para as medidas propostas, quando em comparação com espectrometria atômica, não ultrapassam 5,30 % para amostras de níquel e 8,18 % para análises de cobre. Tais valores são considerados satisfatórios devido à simplicidade de instrumentação do método proposto. Além disso, considerando nível de confiança de 95 %, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos para cinco das seis análises realizadas, sendo encontrada

diferença significativa apenas para a determinação de cobre em uma amostra de moeda de 50 centavos.

**Tabela 2.** Resultados obtidos para análise de níquel em amostras

%Ni <sup>2+</sup>			
	FAAS Teor (%) ± SD	CP Teor (%) ± SD	ER (%)
Moeda 10 centavos	26,09 ± 1,87	25,15 ± 2,72	-5,30
Moeda 20 centavos	26,22 ± 4,72	25,74 ± 4,55	-1,83
Moeda 50 centavos	26,14 ± 1,78	26,53 ± 2,51	1,49

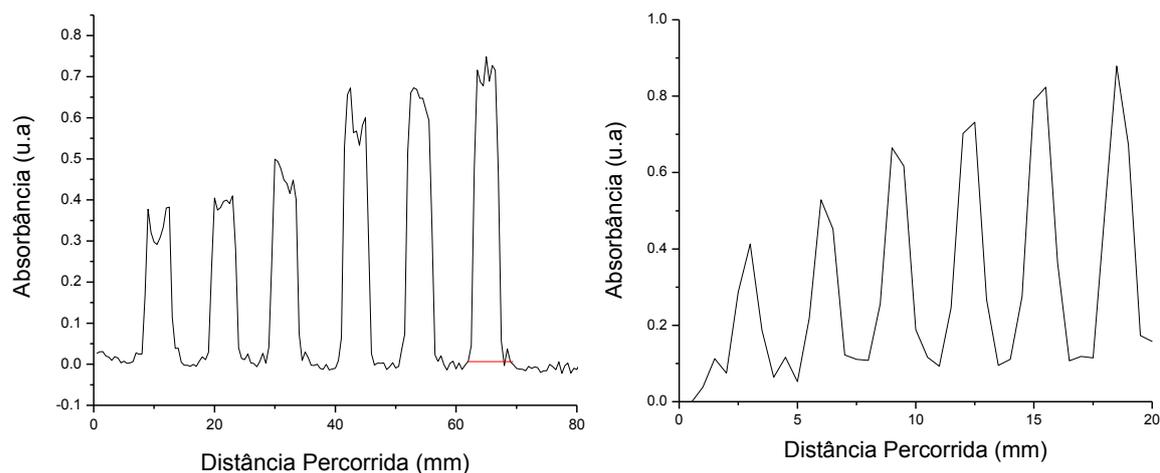
**Tabela 3.** Resultados obtidos para análises de cobre em amostras.

%Cu <sup>2+</sup>			
	FAAS Teor (%) ± SD	CP Teor (%) ± SD	ER (%)
Moeda 10 centavos	75,72 ± 2,68	74,17 ± 4,78	-5,54
Moeda 20 centavos	74,04 ± 1,81	73,31 ± 5,12	-5,60
Moeda 50 centavos	82,02 ± 1,46	74,52 ± 4,77	-8,18

#### **8.4 Determinação de Ni<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> em ligas metálicas por reflectância na região do visível**

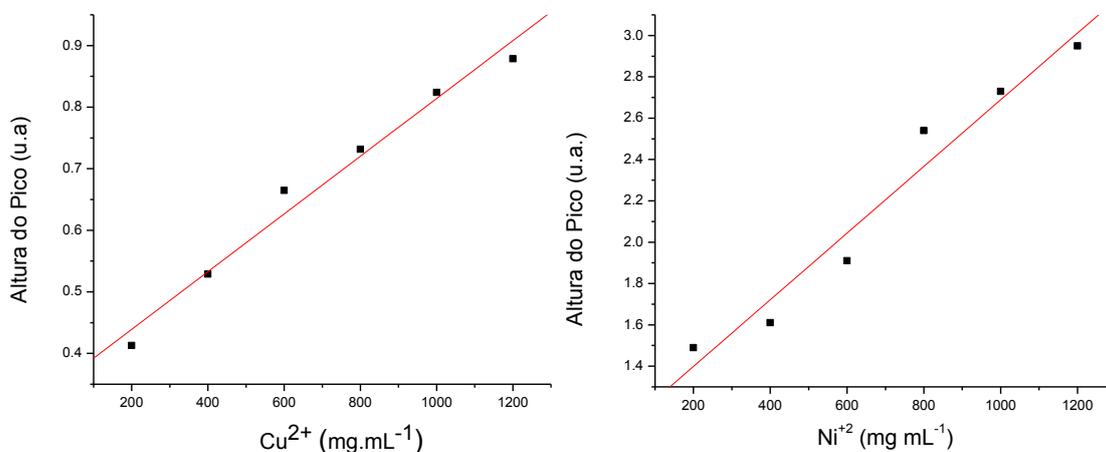
A partir das separações apresentadas na Figura 22 buscou-se obter os espectros de Ni<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> por espectroscopia de reflectância no visível que pudessem ser relacionados com as concentrações de cada íon nas amostras.

A aquisição dos espectros de absorção de cada íon (Figura 24 e Figura 25) permitiu estabelecer as faixas de comprimentos de ondas adequados para a realização das leituras. A Figura 31 apresenta os espectros obtidos para o Ni<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, respectivamente.



**Figura 31.** Espectros obtidos para o  $\text{Ni}^{2+}$  (a esquerda) e  $\text{Cu}^{2+}$  (a direita), para as faixas de concentração de 2 a  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Como pode ser observado, o sistema de detecção proposto permitiu discriminar as intensidades das bandas para as faixas de concentração de 2 a  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada analito e assim, possibilitou a construção da curva analítica (com base nas áreas dos picos dos espectros), para o  $\text{Ni}^{2+}$  ( $y = 1,1 + 0,002 x$ ) e para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $y = 0,35 + 4,7e^{-4} x$ ) ambas com um coeficiente de correlação ( $R$ )  $> 0,988$ , indicando uma tendência linear da calibração. As curvas são mostradas na Figura 32.



**Figura 32.** Curva analítica para a determinação de  $\text{Cu}^{2+}$  (a esquerda) e  $\text{Ni}^{2+}$  (a direita) com base nas áreas dos picos obtidas com medidas realizadas na faixa de 450 nm e 650 nm respectivamente.

Contudo, ao empregar essa metodologia na determinação quantitativa de  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  em amostras reais, como amostras de ligas metálicas, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que as medidas não foram reproduzíveis e valores superiores a 15% foram encontrados para a precisão das medidas. A principal justificativa, para o insucesso desse método em determinações quantitativas de íons metálicos separados por CP, foi a dificuldade em manter o papel a uma distância exata e constante da fibra, haja vista que em estudos anteriores fora comprovada a influência da distância entre a fibra e a

superfície de análise. Ou aspecto limitante do uso dessa técnica nas determinações propostas é que bandas cromatográficas (pontos coloridos no papel) eram maiores que o diâmetro da fibra (bandas ao menos com o dobro do tamanho da fibra). Isso faz com que a medida não seja representativa de toda a banda mas apenas de uma região dela o que leva a inconsistências no sinal.

## 9. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos na detecção por imagens digitais, pode-se concluir que o método de análise proposto é uma alternativa viável, satisfatória e prática para a quantificação de amostras de ligas metálicas por cromatografia em papel, minimizando assim os erros de subjetividade de análises visuais que são comumente utilizadas nesse tipo de cromatografia, proporcionando maior confiança aos resultados. Ainda não sendo um método exato como a espectrometria de absorção atômica em chama, este apresentou-se bastante promissor, devendo se levar em consideração a simplicidade da proposta e baixo custo da instrumentação sendo bem aplicada e facilmente difundida para análises preliminares. Além disso, mais estudos são necessários para atingir uma maior gama de analitos possíveis para a análises.

Por outro lado, a quantificação de amostras de ligas metálicas por reflectância não apresentou resultados satisfatórios que instigassem a exploração dessa em estudos quantitativos para outros analitos. Ainda que a detecção por imagens digitais seja um sistema mais simples ele apresentou melhor funcionamento e resultados mais representativos quando comparada a detecção por reflectância.

# **CAPÍTULO 4**

Cromatografia em Camada Delgada

## **10. UM NOVO MÉTODO ALTERNATIVO PARA A ANÁLISE QUANTITATIVA POR MEIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA UTILIZANDO UM DISPOSITIVO MULTICANAIS E CROMATOGRAMAS COM BASE EM IMAGENS DIGITAIS**

Esta proposta descreve o desenvolvimento de um método inovador, simples e de baixo custo para realizar análises quantitativas por cromatografia em camada delgada (CCD), combinada com a detecção por imagens digitais com revelação no UV. Esse novo sistema permite a aquisição direta dos cromatogramas através da utilização de imagens obtidas por uma *webcam* e *software* específico desenvolvido pelo grupo de pesquisa e escrito em *VisualStudio*.

Seis dispositivos de alumínio contendo, oito canais individuais com uma fina camada de sílica fluorescente foram fabricados em laboratório, avaliados e utilizados para realizar a separação e quantificação de acetaminofeno (ACM), cafeína (CAF), e ácido acetilsalicílico (AAS) em comprimidos comerciais de medicamentos.

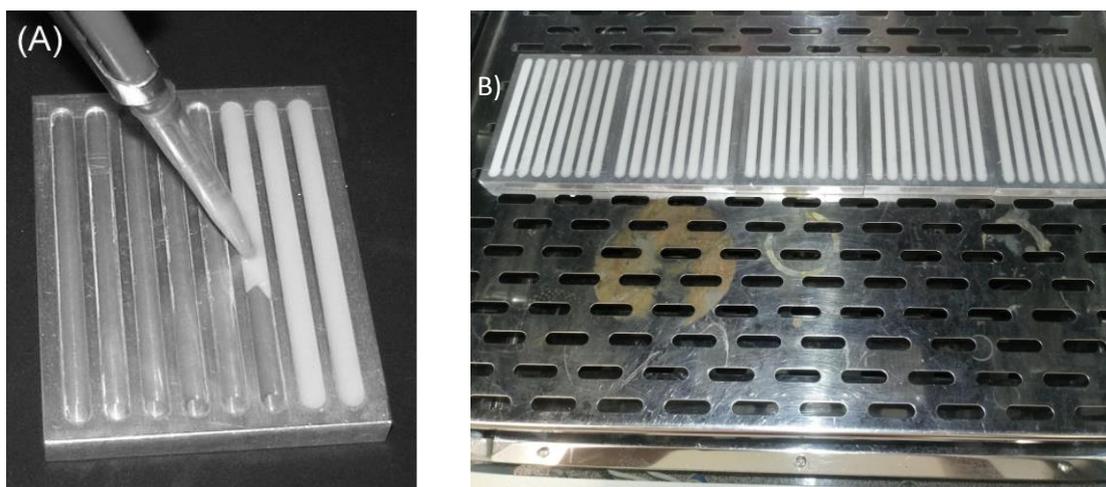
## **11. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### ***11.1 Desenvolvimento das placas cromatográficas***

Para a realização das separações por CCD foi proposto um método alternativo para a confecção de placas cromatográficas em que o suporte pudesse ser reutilizado conferindo assim, menor custo ao final das análises.

Em uma placa de alumínio com dimensões de 100 mm x 80 mm x 10 mm (largura (L) × comprimento (C) × profundidade (P)), foram abertos com o auxílio de uma máquina fresa, oito canais medindo, 95 mm x 60 mm x 1,0 mm (C x L x P). Esses canais formaram reservatórios que permitiram a deposição controlada da suspensão de sílica, a placa é mostrada na Figura 33 (A).

Após a fabricação dos suportes de alumínio preparou-se a suspensão de sílica a partir da mistura de 10 g de sílica gel para CCD (Macherey-Nagel com indicador fluorescente) com 35 mL de água destilada sob branda agitação em uma chapa agitadora. É importante ressaltar que o controle da agitação é essencial para o sucesso da deposição, pois uma agitação vigorosa pode acarretar no aparecimento de bolhas que tornam a superfície cromatográfica irregular, enquanto que uma agitação muito lenta (ou sem agitação) pode favorecer a precipitação da sílica, causando erro de massa/volume na pipetagem da suspensão.



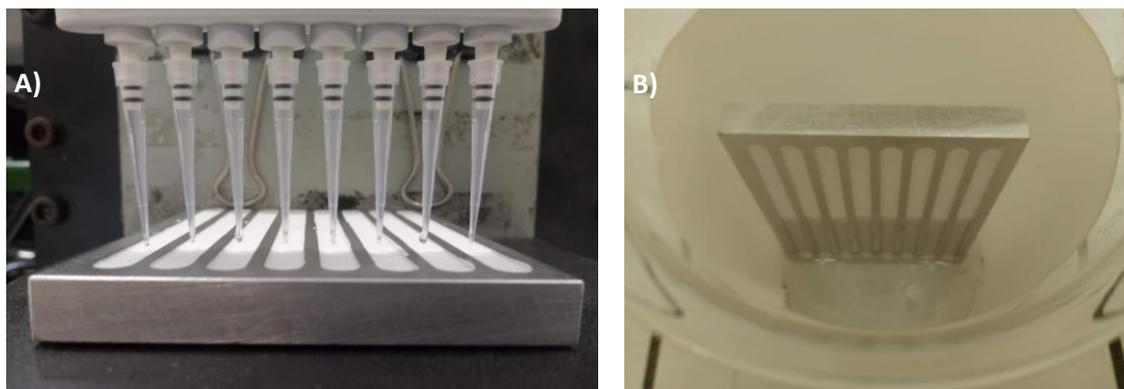
**Figura 33.** Dispositivo proposto para CCD com 8 canais usinados em uma placa de alumínio durante a deposição de suspensão de sílica (A). Procedimento para secagem das placas em estufa (B).

Utilizando uma micropipeta transferiu-se 0,7 mL da suspensão de sílica para cada canal como mostra a Figura 33 (A). Isto foi seguido por leve agitação manual do dispositivo depois de todos os canais terem sido preenchidos para homogeneizar o espalhamento e deposição da sílica. Devido a viscosidade da suspensão, a ponteira da pipeta teve que ser cortada, aumentando assim o diâmetro de saída desta. A secagem e ativação da sílica nas canaletas foram realizadas em estufa de laboratório a 120 ° C por 3 h (Figura 33 (B)). Após a secagem, as placas eram retiradas da estufa e colocadas em uma superfície aberta em temperatura ambiente para posterior utilização.

### ***11.2 Procedimento para a realização das corridas cromatográficas***

Para realizar as aplicações das amostras e das soluções-padrão nas placas cromatográficas desenvolvidas utilizou-se uma micropipeta eletrônica de oito canais (2,0-20,0 mL - Kasvi) que foi afixada por uma garra em suporte universal para reduzir possíveis erros provocados pela variação na posição da aplicação. Abaixo da micropipeta foi adaptado um suporte no qual era colocado as placas.

Esse suporte possuía leve flexibilidade que permitia sua inclinação manual para aproximar a base da placa até a extremidade das ponteiras do pipetador automático e assim executar a aplicações, a adaptação acima descrita pode ser observada na Figura 34 (A). Dessa forma, 4,0 µL das soluções dos padrões e das amostras foram transferidas simultaneamente para as faixas individuais de sílica a uma distância de 2,0 cm das bordas. Após esse procedimento as zonas de aplicação foram secas utilizando um secador de cabelos.

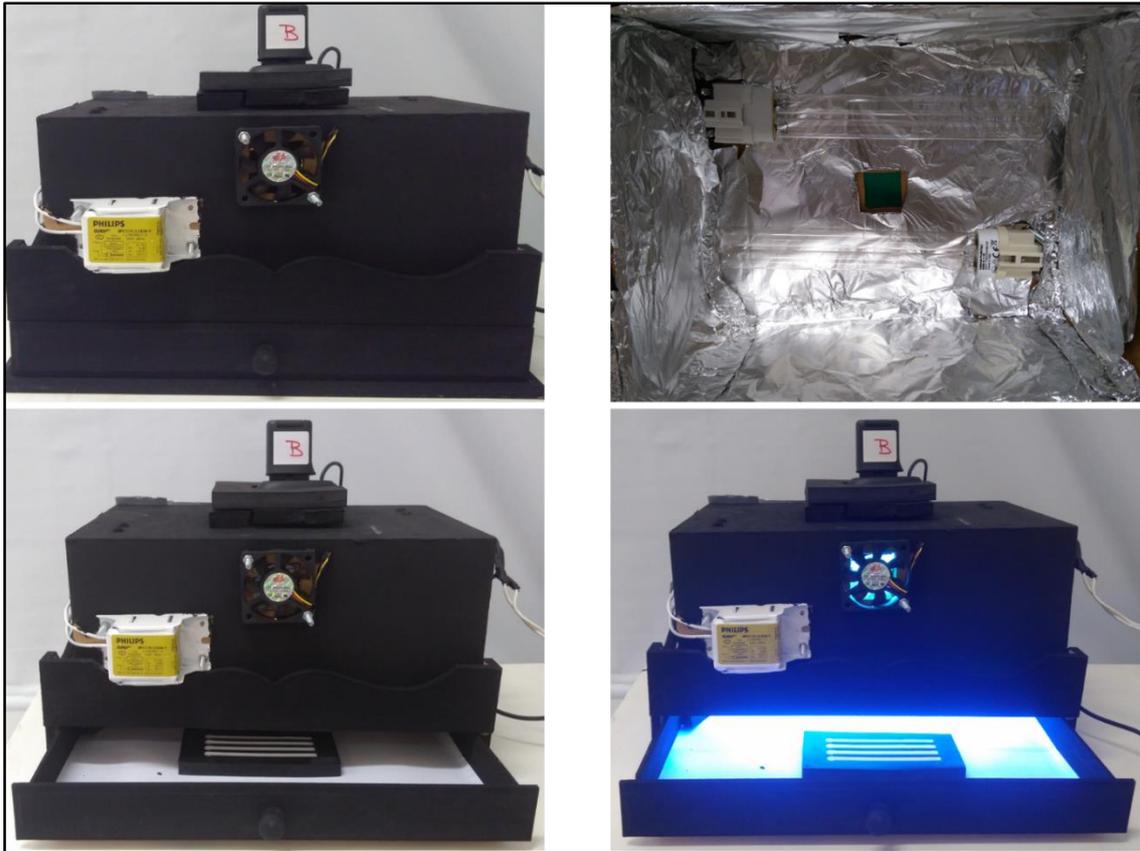


**Figura 34.** Suporte para realizar as aplicações das soluções na placa cromatográfica em (A). Placa de CCD com 5 minutos de eluição em (B)

Para realizar as eluições utilizou-se uma cuba de vidro cilíndrica, com diâmetro interno de 11,0 cm e 14,0 cm de altura na qual foram colocados 80 mL da mistura acetato de etila e ácido acético na proporção 8:2 e uma folha de papel cromatográfico de tamanho adequado para permitir a saturação da cuba. O dispositivo foi então colocado na cuba cromatográfica com a imersão de aproximadamente 0,5 cm das faixas de sílica no solvente (Figura 34 (B)). Após 10 minutos de eluição, a frente do solvente atingiu cerca de 7,5 cm dos canais finalizando a separação dos analitos. Deste modo o dispositivo foi retirado e seco em estufa durante cerca de 10 minutos a 85 ° C.

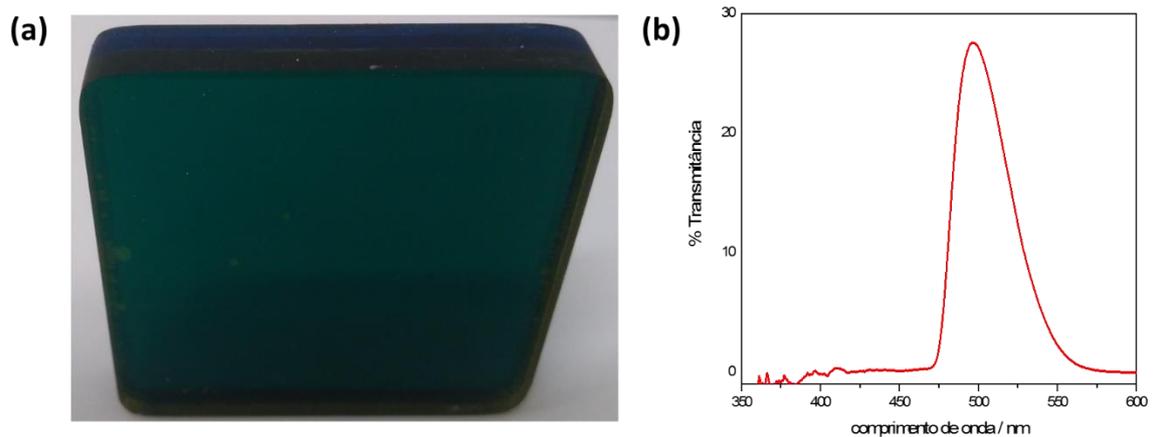
### ***11.3 Construção do ambiente de iluminação controlada***

Para revelação das bandas cromatográficas e realização das medidas utilizando imagens digitais foi necessário a construção de um ambiente de iluminação controlada de radiação UV (254 nm). A Figura 35 mostra imagens da câmara desenvolvida para este propósito na qual duas lâmpadas germicidas (Osram Puritec hns 11 W) foram fixadas na parte interna superior de uma caixa de madeira (MDF) com dimensões de 29 cm × 19 cm × 12 cm (L × C × P) e uma janela de observação (3,0 cm x 2,5 cm) foi aberta entre as lâmpadas para permitir a aquisição de imagens com a *webcam* (Logitech HD C270).



**Figura 35.** Câmara para revelação e leitura cromatográfica sob radiação UV em 254 nm.

Um filtro de absorção óptica com máximo de transmitância em  $500 \pm 20$  nm Figura 36 (a) foi posicionado entre a janela de observação e a *webcam* com o objetivo de filtrar a radiação de excitação da lâmpada. O espectro de transmitância do filtro é apresentado na Figura 36 (b).



**Figura 36.** Filtro óptico de absorção, com transmitância em  $500 \pm 20$  nm em (a) e em (b) o espectro de transmitância do filtro.

Além desses componentes foi adaptado à caixa um *cooler* (5 cm x 5 cm) para permitir a refrigeração do sistema. Na parte inferior da caixa havia um suporte com uma

gaveta móvel que permitiu a inserção das placas cromatográficas e seu posicionamento sob o foco da câmera.

De modo geral, o procedimento de leitura, utilizando o programa descrito na seção 7.4, consiste em posicionar a placa cromatográfica sob o foco da *webcam* e ajustar adequadamente os parâmetros de imagem como brilho, contraste, ganho, exposição, equilíbrio de branco, e intensidade de cor de forma que seja possível observar, com elevada nitidez, as bandas cromatográficas após as corridas e secagem das placas. Durante as leituras, observou-se que o uso de imagens em escala de cinza melhora a identificação e a detecção das bandas cromatográficas, quando comparada com as imagens coloridas.

Assim, as configurações foram ajustadas para fornecer uma imagem em escala de cinza, o que, para o estudo realizado, faz com que os sinais para R G e B apresentem a mesma magnitude durante as leituras. Realizado esse ajuste, os amostradores de R G B são devidamente posicionados e, ao clicar no botão iniciar, o usuário é solicitado a inserir um nome de arquivo que conterá, ao final das leituras, os dados da corrida.

#### ***11.4 Programa desenvolvido para realização das análises com imagens digitais***

A resposta baseada no modelo RGB de imagens digitais foi utilizada para detectar os analitos separados. Assim, o *software* descrito na seção 7.4 foi utilizado para adquirir os sinais e gerar cromatogramas que relacionam a intensidade do sinal com distância percorrida pelas substâncias nos canais da placa de CCD.

#### ***11.5 Medidas de reflectância***

Um novo método de análise topográfica foi proposto para avaliar os perfis de uniformidade da deposição da sílica nos canais. Nesse sistema utilizou-se um espectrômetro VIS-NIR (Ocean Optics-USB-2000) equipado com uma fibra óptica bifurcada (QR600-7-VIS125BX) que foi posicionada sobre a placa enquanto esta era movimentada sob o feixe de radiação com o auxílio de um sistema automatizado equipado com um motor de passo. Para o controle do sistema, um programa foi desenvolvido, escrito em VisualBasic 6.0 A descrição mais detalhada deste sistema encontra-se na seção 7.5 deste trabalho.

#### ***11.6 HPLC***

Para avaliar a exatidão do método proposto, os resultados obtidos para as cinco formulações de analgésicos foram comparados com os valores adquiridos através do

método cromatográfico padrão, HPLC com detecção UV (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet Detector*), e utilizou-se os procedimentos descritos na Farmacopeia Americana para realizar as medidas.

O volume de injeção das amostras foi de 30  $\mu\text{L}$  e as injeções foram feitas de forma automática em um HPLC-UV. A coluna cromatográfica utilizada foi a Brownlee Analytical C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm da marca PerkinElmer. Os parâmetros cromatográficos do método de determinação estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas do HPLC-UV para determinação de CAF, ACM e AAS em medicamentos.

<b>Detector</b>	Lâmpada	UV
	Comprimento de Onda (nm)	275/302
<b>Bomba</b>	Modo de Eluição	Isocrático
	Tempo da corrida (min)	20,0
	Fase Móvel	Metanol: Ácido Acético: Água (28:3:69)
	Fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	2,0
<b>Forno</b>	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25,0
<b>Amostrador</b>	Volume de Injeção ( $\mu\text{L}$ )	30
<b>Soluções</b>	Padrão Interno ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	6,0 Ácido benzoico em metanol
	Solução Padrão ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	0,026 (CAF), 0,1 (ACM) 0,1 (AAS)
	Solução da Amostra ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Concentração desconhecida

### 11.7 Microscopia Confocal

Um microscópio confocal Leica (excitação em 632,8 nm e 785 nm) com uma objetiva de 50x foi usado para focalizar o feixe da radiação laser na amostra e coletar a radiação espalhada.

### 11.8 Reagentes e soluções

#### 11.8.1 Soluções estoques

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água desmineralizada por osmose reversa e para facilitar a dissolução das substâncias, estas foram colocadas em banho ultrassônico por 10 minutos. Os reagentes utilizados possuíam pelo menos 99% de pureza.

A solução estoque de Cafeína, 1,3,7-trimetilxantina (CAF), de concentração igual a 5,00  $\text{mg mL}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 125,00 mg desta substância (Sigma-Aldrich) em água num balão volumétrico de 25,00 mL. Uma solução de estoque contendo

3,00 mg mL<sup>-1</sup> de N-(4-hidroxifenil) etanamida, conhecido por Acetaminofeno (ACM), foi preparado por dissolução de 75,00 mg do fármaco (Sigma-Aldrich) em água, seguida de diluição em um balão volumétrico de 25,00 mL. Uma solução estoque de ácido acetilsalicílico (25,00 mg mL<sup>-1</sup>) foi preparada pela dissolução de 250,00 mg do ácido (Sigma-Aldrich) em uma mistura de etanol / água 2:3 (v / v) num balão volumétrico de 10,0 mL.

#### *11.8.2 Soluções Padrão*

As soluções padrão contendo os três analitos, nas faixas de concentração de: 0,50-3,00 mg mL<sup>-1</sup> de CAF, 0,18-0,63 mg mL<sup>-1</sup> de ACM e 0,70-4,50 mg mL<sup>-1</sup> de AAS foram preparadas pela diluição adequada, em balões volumétricos de 10,0 mL, de alíquotas das soluções estoques em água. As faixas de concentração foram estabelecidas empiricamente para cada analito.

#### *11.8.3 Solução Eluente*

A eluição foi realizada com uma mistura de 80,0 ml de acetato de etila (Merck) e 2,0 mL de ácido acético glacial (Bio-Grade).

#### *11.8.4 Preparo de Amostra*

Como amostras foram usadas 5 marcas de medicamentos comerciais que são muito usados no tratamento de dores de cabeça e enxaqueca. Três deles (Sonridor, Paracetamol + Cafeína Genérico e Tylenol DC) continham apenas dois analitos, ACM e CAF, e dois deles (Doril Enxaqueca e Migrainex) apresentavam os três analitos em sua formulação.

Os comprimidos foram comprados no mercado local e utilizados nos estudos propostos por este trabalho. Três comprimidos de cada fabricante foram pesados e a massa média de cada um foi calculada. Posteriormente eles foram pulverizados num almofariz e a massa correspondente a um único comprimido foi transferida para um béquer e sonicado durante 15 minutos com 30 mL de água. Após isso, a mistura foi centrifugada, e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e diluído com água. Para a determinação quantitativa das substâncias, essas soluções estoques foram adequadamente diluídas em água para satisfazer as faixas de concentração encontradas nas curvas analítica

## 12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *12.1 Avaliação e caracterização dos dispositivos desenvolvidos para CCD*

O suporte utilizado para confeccionar as placas cromatográficas de desenvolvimento vertical, mostrado na Figura 33(A) apresentou um comportamento adequado para esta finalidade, permitindo a fixação homogênea da fase estacionária ao longo de todo o canal. A matéria prima utilizada na fabricação, o alumínio, foi apropriada devido à alta estabilidade térmica e inércia frente a solventes orgânicos ampliando assim, suas possibilidades de aplicação.

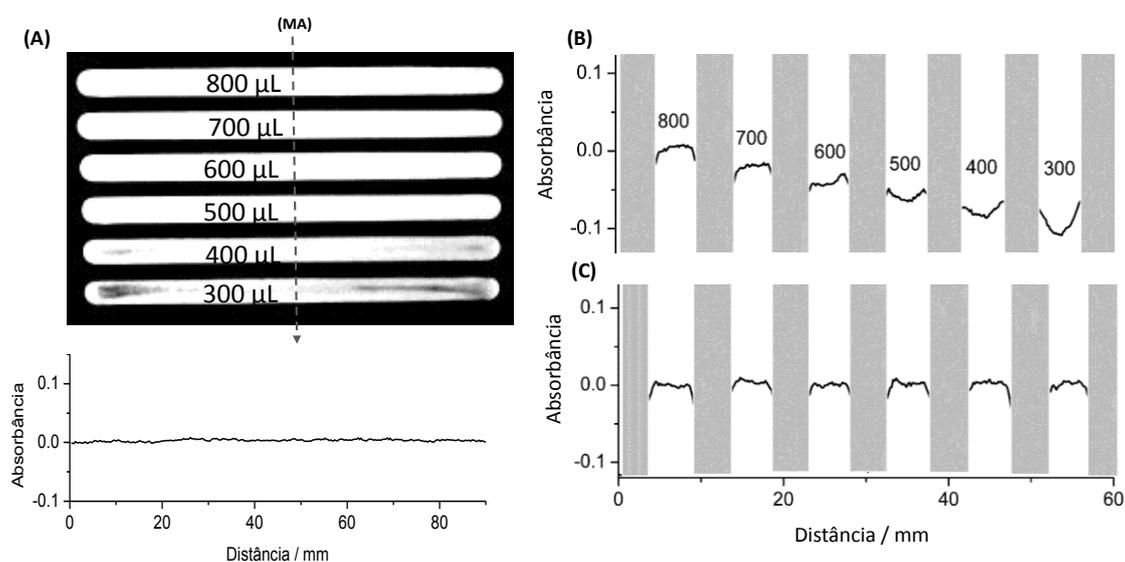
Os suportes também se mostraram como uma alternativa eficiente e de baixo custo para a deposição da fase estacionária de maneira uniforme sem a necessidade de espalhamento controlado da suspensão sobre uma superfície, o que é normalmente realizado para a confecção das placas em laboratório. Outra constatação importante observada durante o trabalho foi a influência da composição da sílica na aderência ao suporte de alumínio. Mesmo suspendendo a sílica 60 H (Merk) em diferentes proporções em água o sólido adsorvente apresentou baixa adesão ao suporte, não sendo possível a realização da corrida cromatográfica vertical com esse tipo de sílica. Alternativamente buscou-se utilizar uma mistura de sílica e amido descrita na literatura<sup>25</sup> mas que também não foi obtido êxito devido à falta homogeneidade nas superfícies dos canais quando secos.

Ao se testar a sílica GF<sub>254</sub> observou-se melhor uniformidade e melhor aderência ao suporte, até mesmo a sílica que permanece em contato direto com a solução do eluente não foi removida, possibilitando o seu uso. Além disso notou-se que o processo de deposição possibilitou que todos os canais do mesmo suporte apresentassem velocidades de corrida semelhantes. Como mostra a Figura 34 (B), a frente do solvente se encontra em posições similares nas fases estacionárias após 5 minutos do início da corrida, o que pode indicar uma boa repetibilidade do processo de fabricação das placas cromatográficas.

Após estabelecer o tipo de sílica ideal para a confecção dos canais, foi necessário estabelecer a quantidade/volume de sílica que seriam transferidos para as canaletas, tendo em vista que a espessura das faixas de sílica pode ser ajustada controlando o volume de suspensão depositada (28% Água/Sílica) nos canais gravados sobre a placa de alumínio.

Como pode ser visto na Figura 37 (A) e (B) as eficiências de revestimento da superfície e dos perfis topográficos das faixas de sílica, são alteradas de acordo com diferentes volumes de aplicação da suspensão. A fotografia adquirida sob radiação UV na Figura 37 (A) mostra que, volumes inferiores a 500  $\mu\text{L}$  não são adequados para cobrir a parte inferior do reservatório, de modo que as regiões mais escuras nos canais da placa evidenciam as regiões onde a sílica não recobriu totalmente a superfície do alumínio, resultando em uma superfície com perfis em forma “U” como pode ser observado na variação de perfil na seção transversal da trilha de sílica para os canais com 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$  na Figura 37 (B).

Por outro lado, para volumes maiores que 600  $\mu\text{L}$  os perfis das superfícies se tornam mais uniformes, sem evidência de uma falta de sílica no centro da trilha (Figura 37 (A)). Considerando isto, utilizou-se o volume de 700  $\mu\text{L}$  de suspensão no processo de deposição. Isto proporcionou a deposição de trilhas planas de sílica com aproximadamente 0,5 mm de espessura.<sup>107</sup> que corresponde às espessuras de placas de TLC feitas em laboratório, onde uma suspensão de sílica é espalhada sobre placas de vidro ou alumínio.<sup>107</sup>



**Figura 37.** Fotografia dos canais de sílica obtidos pela deposição de diferentes volumes ( $\mu\text{L}$ ) de suspensão de sílica (A), perfis de absorvância das superfícies dos canais preenchidos com diferentes volumes da suspensão de sílica (B) leituras de seis diferentes canais preenchidos com 700  $\mu\text{L}$  (C) e respostas de absorvância ao longo uma canal de sílica obtido com a deposição de 700  $\mu\text{L}$  de pasta de sílica (D). Indicação da posição e direção das medidas de absorvância (MA). \* Medidas de absorvância realizadas em 500 nm.

É importante relatar que os perfis superficiais dos canais de sílica foram estimados por uma técnica que não é usualmente utilizada para este fim monitorando-se a absorvância a 500 nm com uma fibra óptica bifurcada acoplada a um espectrômetro VIS / NIR, enquanto as faixas de sílica são movidas sob o feixe de radiação (Secção 7.5).

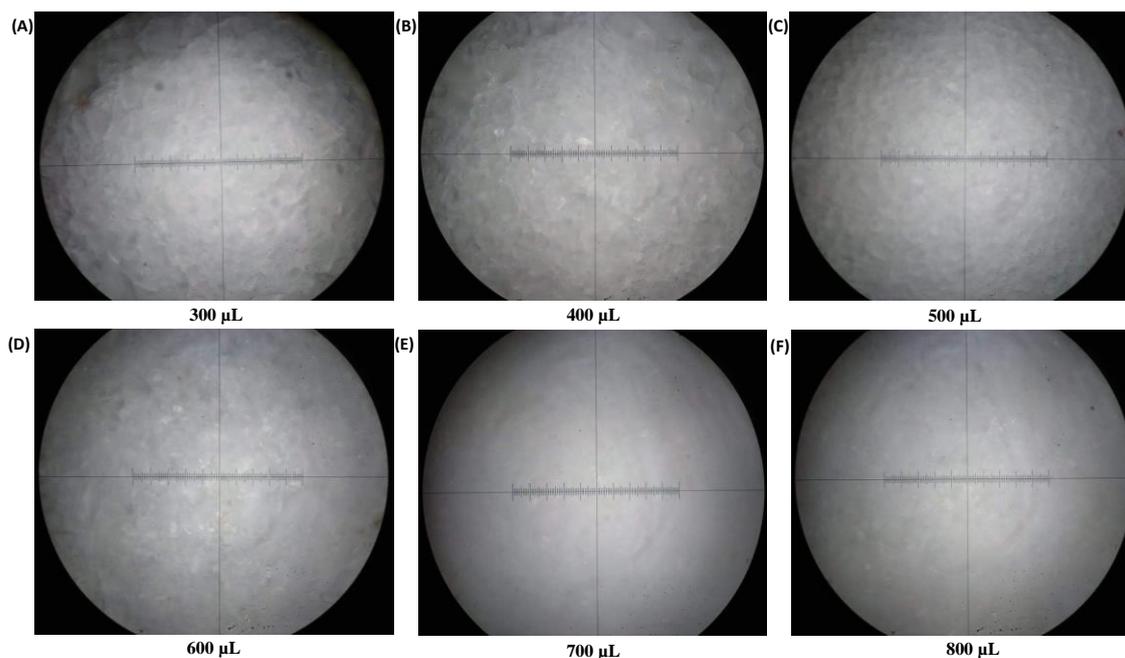
Embora a técnica proposta não forneça informações sobre as dimensões, ela pode ser usada para fornecer uma boa estimativa dos perfis, porque o sinal de absorvância nesse comprimento de onda depende da distância entre a fibra óptica e a superfície da sílica. Portanto, se a fibra estiver mais distante da superfície da sílica, o sinal de absorvância é menor, e se a fibra estiver mais próxima dessa superfície, o sinal é maior.

Utilizando essa técnica de caracterização, foram adquiridas as respostas de absorvância, para os diferentes canais resultantes da deposição de 700 µL de suspensão de sílica. Como mostrado na Figura 37 (C), os perfis são bastante semelhantes para múltiplos canais e apresentam uma variação muito pequena no sinal de absorvância ( $0,00 \pm 0,01$ ). Isto demonstra uma reprodutibilidade adequada dos procedimentos de deposição.

Além disso, a Figura 37 (D) mostra que as medidas de absorvância realizadas em 500 pontos ao longo do canal de sílica apresentam pequenas variações ( $0,00 \pm 0,01$ ). Isso indica que há uma uniformidade adequada da camada sobre toda a extensão do reservatório.

O perfil superficial dos canais também foi investigado utilizando a microscopia confocal. Essa técnica permitiu enxergar com precisão a distribuição da sílica ao longo dos canais. Como pode ser observado na Figura 38 quanto menor a quantidade de suspensão colocada nos canais menor a homogeneidade da superfície, resultando em um canal poroso e irregular, fatores esses que prejudicam, o tempo e a homogeneidade da corrida, a separação e a distribuição das bandas.

A medida que o volume de sílica aplicado nos reservatórios aumentam aumenta-se também dispersão do adsorvente, produzindo assim superfícies mais compactadas e lisas (Figura 38 (D-F)), que produzirão separações mais eficientes e bandas mais nítidas com melhor resolução. Os resultados encontrados na microscopia corroboram os perfis estabelecidos pela análise de absorvância.



**Figura 38.** Imagens obtidas por microscopia confocal dos canais preenchidos com diferentes volumes de suspensão de sílica.

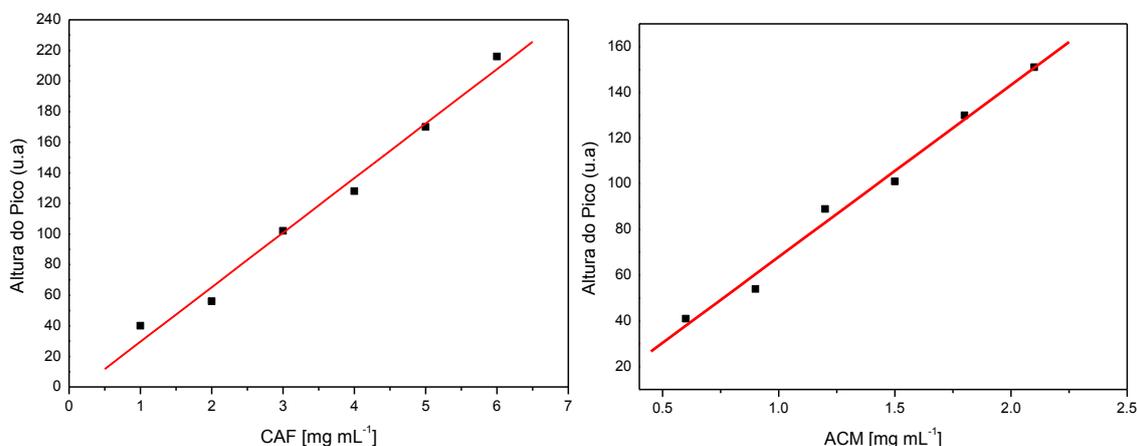
### ***12.2 Avaliação do sistema de detecção baseado em imagens digitais na determinação de dois analitos***

Após a caracterização das placas, essas foram usadas para realizar a separação e quantificação de ACM e CAF para avaliar o desempenho dos dispositivos propostos. Para as determinações, soluções padrão contendo CAF e ACM nas faixas de  $1 - 6 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,4 - 2,2 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente, foram utilizadas para estabelecer as curvas analíticas.

O estudo permitiu a construção das curvas analíticas ( $y_{\text{ACM}} = 75.24x - 7.24$ ), ( $y_{\text{CAF}} = 35.65x - 6.13$ ) que são apresentadas na Figura 39, as quais foram obtidas empregando-se as alturas dos picos. Coeficientes de correlação (R) de 0.9925 para CAF e de 0.9938 para ACM, indicaram uma tendência linear satisfatória das calibrações, considerando que as curvas foram construídas com 6 pontos baseadas exclusivamente em uma análise direta por imagens digitais.

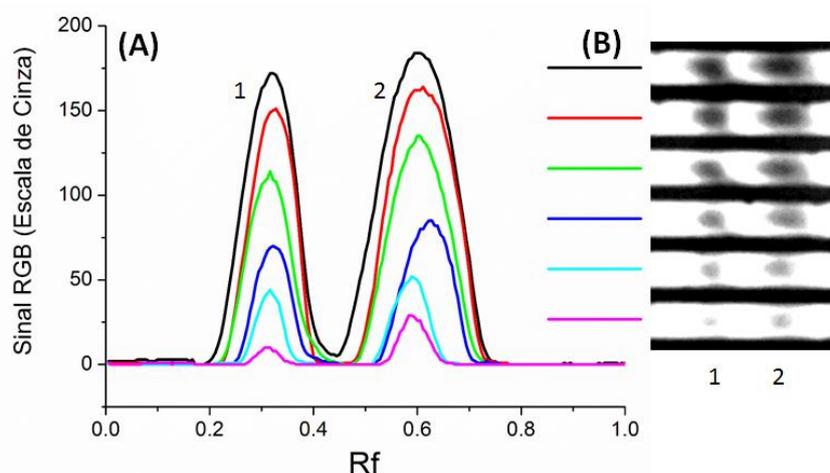
Os limites de detecção de  $0,52 \text{ mg mL}^{-1}$  para CAF e de  $0,79 \text{ mg mL}^{-1}$  para ACM foram obtidos através da equação  $y_{LD} = y_b + 3 S_{y_b}$ , onde  $y_b$  é o intercepto em y obtido a partir da curva de calibração e  $S_{y_b}$  é o desvio padrão deste intercepto. Os limites obtidos indicam que o sistema cromatográfico e o método de detecção desenvolvidos são boas alternativas na separação e quantificação de fármacos. O limite de quantificação (LQ) calculado foi de  $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$  para CAF e de  $2,37 \text{ mg mL}^{-1}$  para ACM foram obtidos através da equação  $LQ = 3 LD$ .

Ainda, é importante relatar que, acima das faixas de concentração apresentadas, observou-se a saturação do sinal analítico tendo em vista que os sinais em RGB variam de 0 – 255 e, abaixo dos valores de concentração apresentados anteriormente, não foi possível detectar as substâncias.



**Figura 39.** Curvas analíticas para determinação de CAF à esquerda e ACM à direita.

Na Figura 40 é apresentado os cromatogramas, com elevadas razões S/R para os analitos, e a imagem da placa adquirida em escala de cinza. Observou-se que o uso de imagens em escala de cinza, quando comparadas às imagens coloridas, melhora a identificação e a detecção dos pontos cromatográficos.



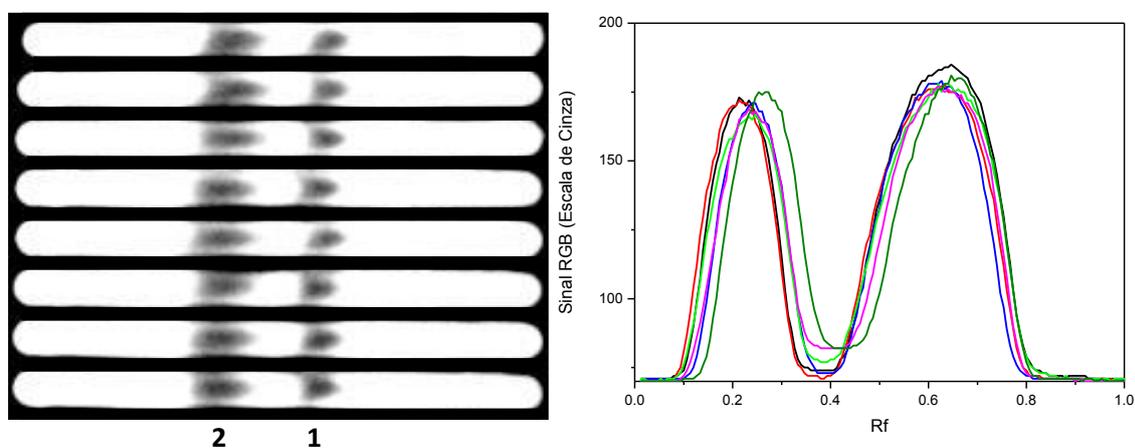
**Figura 40.** Cromatogramas (A) e imagem da placa (B) para corridas com cafeína (1,0 a 6,0 mg mL<sup>-1</sup>) e paracetamol (0,2 a 2,1 mg mL<sup>-1</sup>) indicados pelos números 1 e 2, respectivamente

De fato, com o uso dessa estratégia (escala de cinza), a fluorescência verde da sílica é eliminada, e o sinal da linha de base pode ser ajustado para zero para reduzir significativamente o ruído ajustando o contraste da imagem ao nível máximo e variando adequadamente o brilho antes da aquisição do sinal. Portanto, uma ampla faixa de resposta RGB (0–255) pode ser usada para detecção o que, para o estudo realizado, faz

com que os sinais para R G e B apresentem a mesma magnitude durante as leituras e fornecem respostas idênticas como consequência das imagens incolores.

Também é importante considerar que o sinal no cromatograma resulta da diferença de um canal RGB (R, G ou B) e o valor de um pixel branco (255), que fornece um pico (sinal aumenta da região branca dos canais para pontos cinza ou preto) quando a detecção é realizada.

Para avaliar a repetibilidade de todo o processo, desde a fabricação do dispositivo até a aquisição do sinal analítico, realizou-se várias corridas cromatográficas com uma solução contendo  $4,4 \text{ mg mL}^{-1}$  de CAF e  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$  de ACM. As bandas cromatográficas resultantes da separação apresentaram desempenho similar para os parâmetros  $R_f$  e altura do pico, onde foi observado pequena variação nos valores de  $R_f$ , sendo obtido valores médios de 0,24 (CAF) e 0,63 (ACM) com precisão de 4,91% e 0,81% enquanto que, para a altura do pico, os valores médios obtidos foram de, 172,86 (CAF) e 178 (ACM) com precisão de 1,54 % e 0,94% respectivamente. O que mostra que o procedimento é bastante reprodutível evidenciando que a técnica desenvolvida é aceitável para análises quantitativas. As imagens, da placa e dos cromatogramas, são apresentadas na Figura 41.



**Figura 41.** Fotografia do dispositivo proposto sob radiação UV (à esquerda) após a separação de CAF  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$  (1), ACM  $4,4 \text{ mg mL}^{-1}$  (2) e os cromatogramas, baseados em imagens digitais adquiridos para os oito canais da placa.

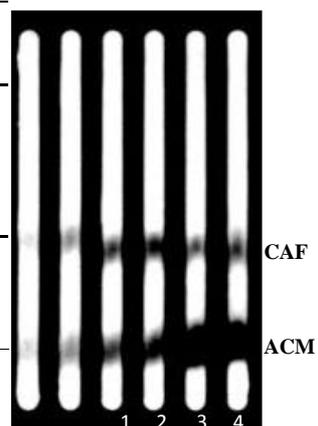
### *12.3 Determinação de CAF e ACM em medicamentos*

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto, o sistema foi empregado na quantificação de CAF e ACM em três formulações comerciais de medicamentos para tratar dor de cabeça. De modo geral, uma boa exatidão foi conseguida para ambos analitos quando comparados com os valores de referência dos rótulos.

Erros variando de 1,05% - 2,03% para CAF e 0,1% - 2,60% para ACM, sugerem que a detecção por imagens digitais pode realizar determinações quantitativas em separações por CCD. Os valores médios das concentrações de CAF e ACM obtidos foram testados por teste *t* a um nível de confiança de 95% e essas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, como pode ser observado na Tabela 5 e Figura42.

**Tabela 5.** Valores de concentração e seus respectivos erros.

Comprimido	[CAF] mg/comprimido ± SD	Rótulo mg/Comprimido	Erro (%)
C1	66,0 ± 2,0	65	1,5
C2	66,3 ± 2,1	65	1,4
C3	65,7 ± 0,6	65	-0,6
Comprimido	[ACM] mg/comprimido ± SD	Rótulo mg/Comprimido	Erro (%)
C1	502,0 ± 15	500	0,5
C2	500,5 ± 3,8	500	0,10
C3	513,0 ± 0,7	500	2,70

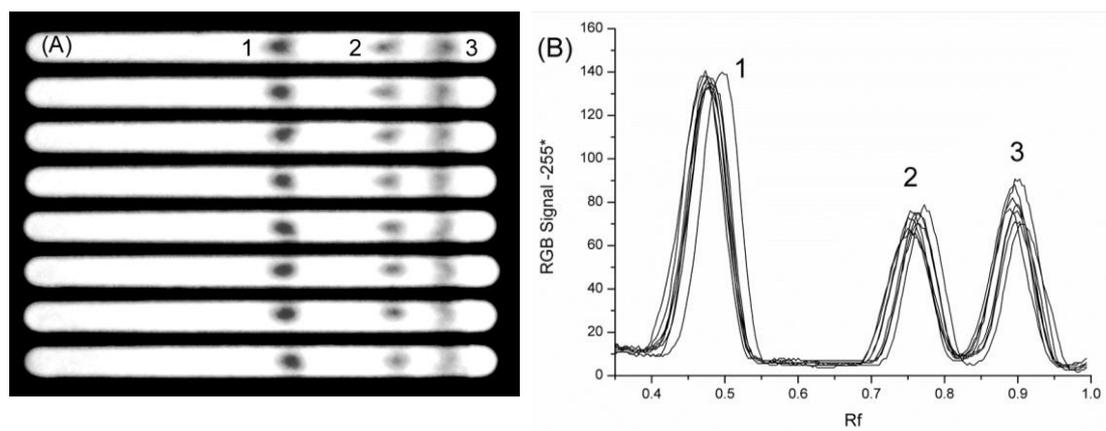


**Figura42.** Corrida cromatográfica dos padrões (1-4) e da amostra (5 e 6).

Devido à melhor sensibilidade e a uma relação sinal / ruído superior, a detecção e quantificação é frequentemente realizada por HPLC, mas os estudos comprovaram uma ótima eficiência do sistema desenvolvido mostrando que este pode ser uma alternativa para determinações quantitativas por ser uma opção menos dispendiosa, portátil e de fácil aplicação in loco.

#### ***12.4 Avaliação do sistema de detecção baseado em imagens digitais na determinação de três analitos***

A Figura 43 mostra uma imagem do dispositivo exposto à radiação UV após a separação dos analitos (CAF 1,50 mg mL<sup>-1</sup>, ACM 0,36 mg mL<sup>-1</sup> e AAS 2,25 mg mL<sup>-1</sup>) com os cromatogramas resultantes baseados em imagem digital.



**Figura 43.** Fotografia do dispositivo proposto sob radiação UV (A) e cromatograma baseado em imagens digitais (B) adquiridos nos oito canais. Pontos para CAF 1,50 mg mL<sup>-1</sup>, ACM 0,36 mg mL<sup>-1</sup> e AAS 2,25 mg mL<sup>-1</sup> (3).

\* Resposta para um dos canais RGB subtraídos do valor de um pixel branco (255).

As médias e os desvios padrões calculados para os  $R_f$  e para as alturas dos picos, dos analitos separados em oito canais do dispositivo cromatográfico são apresentados na Tabela 6. A precisão para  $R_f$  (CV <2%, n = 8) mostra que os canais individuais de sílica apresentam desempenho semelhante para a separação dos analitos. Isto indica que os erros aleatórios, que poderiam ocorrer durante o processo de fabricação, não influenciaram significativamente na aplicação da proposta.

Para as alturas dos picos coeficientes de variação de 0,7%, 5,5%, e 7,7% (n = 8) foram estimados para CAF, ACM e AAS, respectivamente. Apesar do fato de que as áreas de pico serem mais comumente usadas como sinal analítico para fins quantitativos, uma melhoria significativa na precisão não foi detectada quando as áreas foram usadas em vez das alturas dos picos. Assim, como as alturas dos picos são mais fáceis e rapidamente estimadas, elas foram usadas como sinais analíticos.

**Tabela 6.** Fatores de retenção e alturas dos picos calculados para CAF (1,5 mg mL<sup>-1</sup>), ACM (0,36 mg mL<sup>-1</sup>) e AAS (2,25 mg mL<sup>-1</sup>) com base no cromatograma descrito na Figura 43.

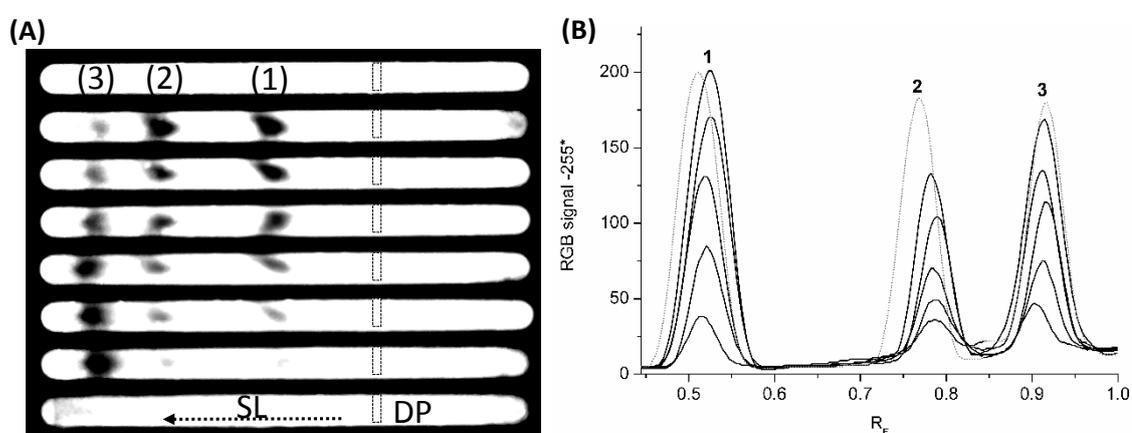
	$R_f$ (Média ± SD)	Altura do Pico (Média ± SD)
CAF	0,48 ± 0,01	140 ± 1
ACM	0,77 ± 0,01	73 ± 4
AAS	0,90 ± 0,01	78 ± 6

As variações na resposta RGB em cada canal do método proposto, deve-se a uma série de fatores tais como, a uniformidade da irradiação de luz UV sobre o dispositivo de CCD, a precisão na aplicação dos volumes de padrão e de amostra nos canais, as espessuras das camadas de sílica, entre outras. Tendo em vista esses interferentes, pode-

se afirmar que o CV estimado para alturas dos picos dos analitos estudados indicam uma precisão satisfatória das separações por CCD com detecção por imagens digitais.

Para construir as curvas analíticas dos três analitos, seis soluções padrão foram preparadas. Para proporcionar uma separação e detecção mais eficiente de todos os compostos estudados em uma única etapa cromatográfica, foi necessário ajustar as faixas de concentração das soluções padrão e prepará-las com concentrações crescentes de ACM e concentrações decrescentes de AAS, evitando a sobreposição de picos.

Os cromatogramas representados na Figura 44 (B) foram adquiridos a partir da imagem em escala de cinza do dispositivo de CCD após a separação dos analitos para seis soluções padrão Figura 44 (A).



**Figura 44.** (A) Imagem em escala de cinza do dispositivo sob radiação UV. Bandas cromatográficas dos analitos, CAF 0,50–3,00 mg mL<sup>-1</sup> (1), ACM 0,18–0,54 mg mL<sup>-1</sup> (2), AAS 0,70–4,50 mg mL<sup>-1</sup> (3) Indicação dos delimitadores de pixels (DP) e do sentido das leituras (SL). (B) Cromatogramas baseados em imagem adquiridos para CAF (1) 0,50 a 2,50 mg mL<sup>-1</sup>, ACM (2) 0,18 a 0,45 mg mL<sup>-1</sup> e AAS (3) 0,7 a 3,75 mg mL<sup>-1</sup>. Picos em linhas pontilhadas não foram usados para fins de calibração.

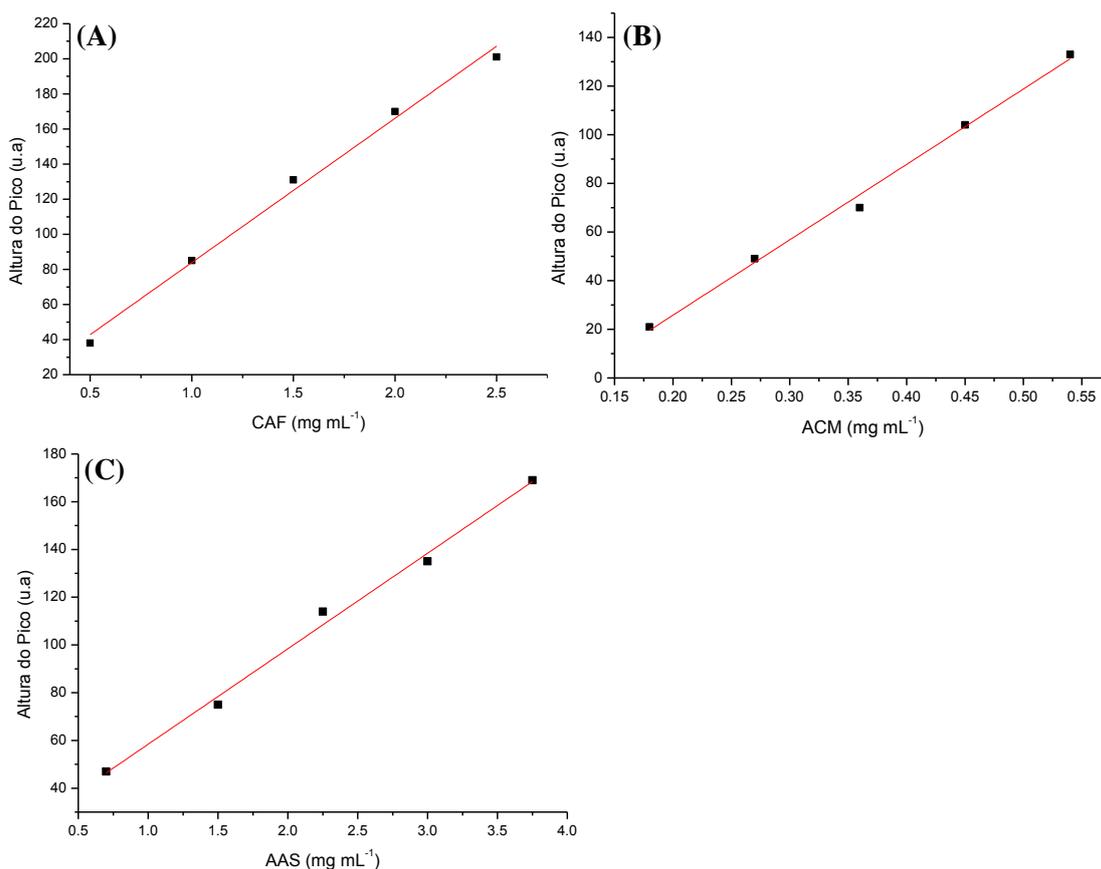
De fato, como observado nos cromatogramas da Figura 44, os pontos foram adequadamente detectados com relações sinal-ruído aceitáveis, fornecendo a distinção de pelo menos cinco concentrações por analito. Além disso, como os canais do dispositivo de CCD proposto limitaram o alargamento lateral das bandas mais concentradas e devido o fato dos delimitadores de pixels (DP) cobrirem toda a largura do canal, não foi necessário realizar a detecção individual dos pontos usando software adicional após a aquisição das imagens, como ocorre em outros métodos que utilizam placas de CCD comerciais.<sup>11,94</sup> Portanto, os sinais analíticos para todos os analitos em diferentes concentrações são simultaneamente adquiridos em todas as faixas em uma única imagem em tempo real, o que facilita os procedimentos para os usuários não familiarizados.

Para CAF e AAS, picos adquiridos para os padrões mais concentrados, indicados por uma linha tracejada na Figura 44, apresentaram alturas semelhantes às dos padrões imediatamente menos concentrados, inferindo uma possível saturação dos sinais RGB para concentrações mais elevadas. Considerando isto, o padrão mais concentrado para cada analito não foi considerado para fins de calibração. Apesar da possibilidade de realizar calibração linear com seis níveis de concentração para o ACM, o padrão mais concentrado também foi excluído das curvas analíticas de modo a combinar com o número de padrões (cinco) utilizados para a calibração da CAF e AAS.

Com base nas alturas dos picos adquiridos para os padrões de CAF, ACM e AAS, as curvas analíticas foram calculadas e representadas graficamente, como pode ser visto na Figura 45, com coeficientes de correlação linear ( $r > 0,99$ ) apropriados, evidenciando o emprego da estratégia proposta para uma calibração eficaz. A Tabela 7 traz as curvas analíticas de cada analito bem como os valores dos coeficientes e os limites de detecção (LD) estimados.

**Tabela 7.** Resultados para calibração e seus respectivos coeficientes de correção linear baseados nas alturas dos picos e limites de detecção estimados.

Analito	Faixa de concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R	LD (mg mL <sup>-1</sup> )	LQ (mg mL <sup>-1</sup> )
CAF	0.50 – 2.50	$y = 82.2 x + 1.7$	0.997	0.40	1.2
ACM	0.18 – 0.45	$y = 310 x - 36.2$	0.998	0.20	0.6
AAS	0.70 – 3.75	$y = 40 x + 18.41$	0.996	0.60	1.8



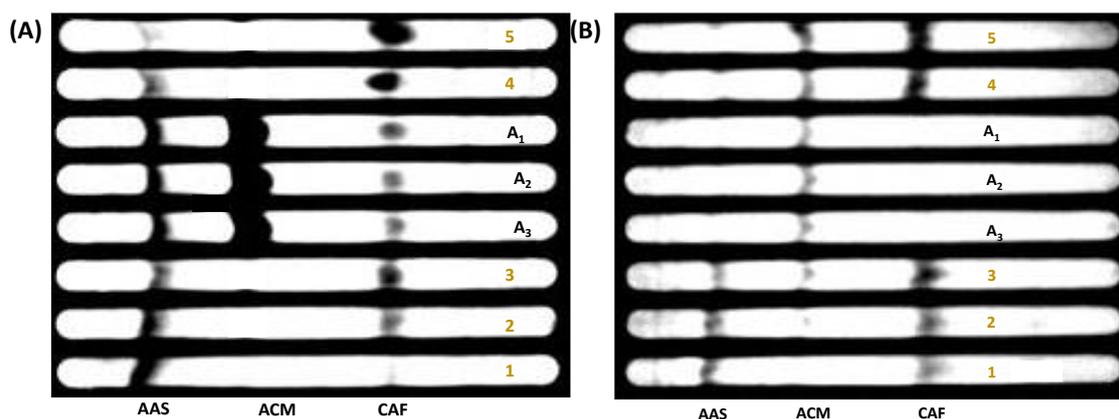
**Figura 45.** Curvas analíticas para a determinação de CAF 0,50-2,50 mg mL<sup>-1</sup> em (A), ACM 0,18 a 0,45 mg mL<sup>-1</sup> em (B) e AAS 0,7 a 3,75 mg mL<sup>-1</sup> em (C) com base nas alturas dos picos obtidas com medidas realizadas por imagens digitais e revelação UV

Os LD, também listados na Tabela 7, foram determinados realizando a separação cromatográfica para soluções padrão menos concentradas do que as usadas para fins de calibração que continha concentrações crescentes dos analitos. As imagens resultantes foram monitoradas para encontrar a concentração mínima capaz de proporcionar uma resposta RGB diferente daquela da solução do branco. Os valores estimados foram semelhantes aos encontrados com outros métodos de CCD realizadas com placas comerciais<sup>11</sup> e atendem as concentrações necessárias para realizar a determinação dos fármacos estudados em preparações comerciais.

### ***12.5 Determinação de CAF, ACM e AAS em medicamentos***

Com o sucesso na separação e quantificação de três analitos simultaneamente, dois fármacos comerciais foram submetidos a análise pelo sistema desenvolvido a fim de testar a precisão do método. Os resultados obtidos foram comparados com os valores adquiridos pelo método de referência (HPLC) e com as informações contidas no rótulo do produto. Devido ao sistema apresentar um LD menor para o ACM e este possuir elevada

concentração nos medicamentos houve a necessidade de realizar as medidas em momentos diferentes, sendo que, em uma placa adquiriam-se os sinais para CAF e AAS (Figura 46(A)) e em outra placa realizava-se as leituras para ACM com a solução da amostra mais diluída (Figura 46(B)). É importante relatar que as soluções das amostras foram aplicadas nos canais mais internos da placa ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ) a fim de minimizar alguns efeitos ocasionados pela falta de total uniformidade da iluminação.



**Figura 46.** Imagem, em escala de cinza, da placa sob radiação UV para a quantificação de CAF e AAS em amostra de medicamento (A) e imagem da placa após a separação cromatográfica da solução mais diluída da amostra para quantificação de ACM (B).  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  indicam os canais onde foram aplicadas as amostras e 1-5 indicam os canais onde foram aplicados os padrões, sendo estes crescentes para CAF e ACM e decrescentes para AAS.

Como listado na Tabela 8, erros relativos abaixo de 5% foram encontrados para a maioria dos analitos estudados e nenhuma diferença significativa foi observada comparando os conteúdos encontrados em um nível de confiança de 95%. Portanto, foi demonstrado que o aparelho proposto em laboratório pode ser usado com precisão adequada para quantificar o conteúdo dos medicamentos presentes em comprimidos.

**Tabela 8.** Resultados para a determinação de CAF, ACM e AAS em comprimidos comerciais de analgésicos para enxaqueca

CAF					
Amostra	TLC*	Rótulo*	Erro (%)	HPLC*	Erro (%)
A	66.3 ± 1.0	65	2	65.7 ± 1.3	0.9
B	63.7 ± 3.0	65	-1.9	66.1 ± 1.8	-3.6
ACM					
Amostra	TLC*	Rótulo*	Erro (%)	HPLC*	Erro (%)
A	249.2 ± 11.5	250	-0.3	250.4 ± 0.6	-0.5
B	255.0 ± 9.0	250	2	250.4 ± 0.4	1.8

AAS					
Amostra	TLC*	Rótulo*	Erro (%)	HPLC*	Erro (%)
A	261.0 ± 7.0	250	4.4	247.7 ± 0.6	5.4
B	241.8 ± 3.7	250	3.3	251.4 ± 0.3	3.8

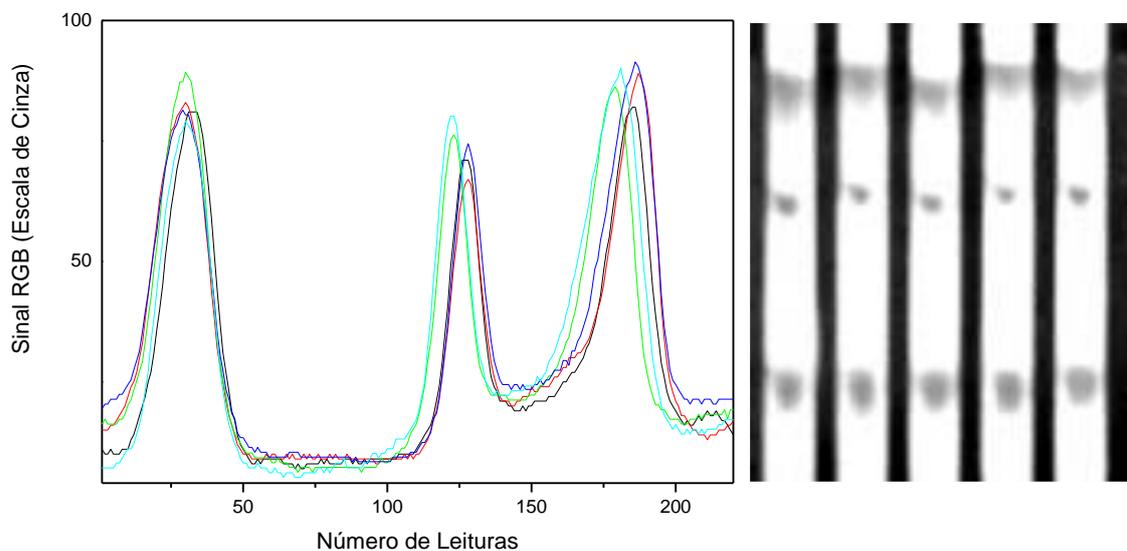
\* mg por comprimido (média ± SD)

Ainda, é importante destacar que todos os aparelhos utilizados para realizar os estudos, incluindo: os seis dispositivos multicanais usinados em alumínio para a deposição de sílica, a *webcam*, a caixa, e as lâmpadas UV para a detecção baseada em imagens digitais foram comprados por um custo de aproximadamente R\$ 350,00. Este é um kit de baixo custo, se considerarmos a informação analítica que pode ser acessada com o seu uso. Além disso, uma placa de CCD comercial com a mesma área da placa feita em laboratório e capaz de executar separações idênticas para oito soluções aplicadas paralelamente é cerca de 10 vezes mais cara que o dispositivo de CCD proposto.

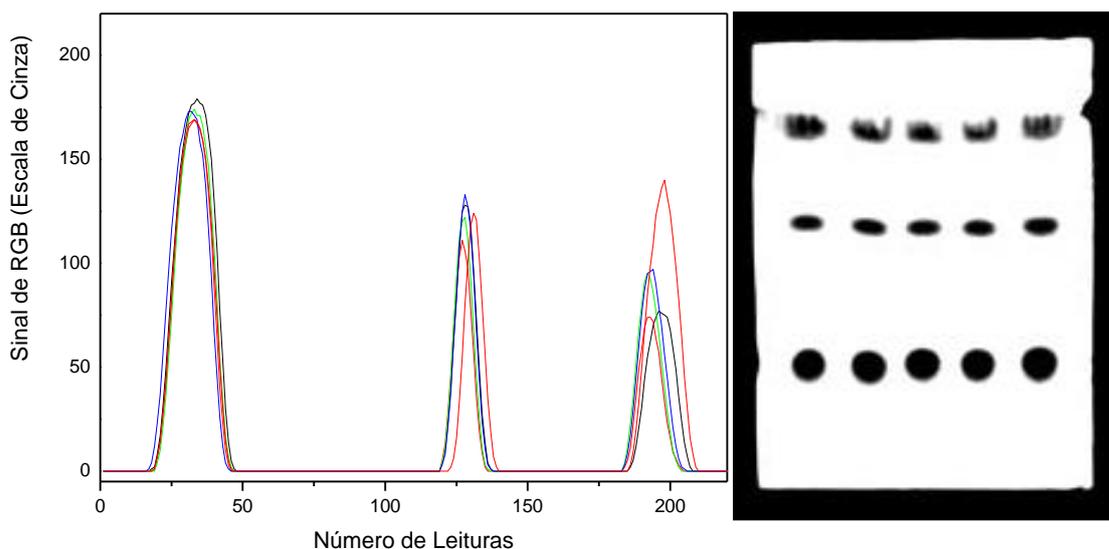
### 12.6 Estudos Comparativos

Os dispositivos desenvolvidos foram comparados com placas de CCD comerciais (Sigma Aldrich, Placa para CCD com indicador Fluorescente 254 nm 10 cm x 6 cm) quanto a linearidade das curvas analíticas, a repetibilidade do sinal analítico e do  $R_F$  e o desempenho na separação de volumes menores e maiores.

A solução padrão contendo CAF (1,5 mg mL<sup>-1</sup>) ACM (0,36 mg mL<sup>-1</sup>) e AAS (2,25 mg mL<sup>-1</sup>) foi aplicada na placa *lab-made* e na placa comercial e em seguida, realizou-se a eluição, sob as mesmas condições, para as duas placas. Os cromatogramas e as imagens das placas podem ser vistas nas Figura 47 e Figura 48 respectivamente.



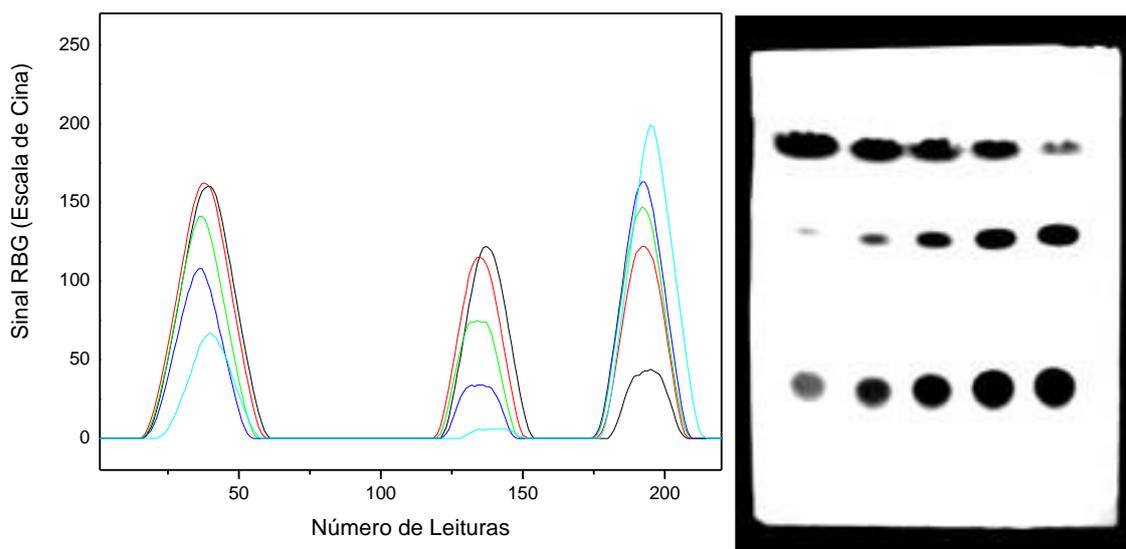
**Figura 47.** Cromatograma (esquerda) e imagem da placa (direita) após a separação do padrão contendo CAF (1), ACM (2), AAS (3). A mesma solução foi aplicada em 5 canais.



**Figura 48.** Cromatograma (esquerda) e imagem da placa de CCD comercial (direita) após a separação do padrão contendo CAF (1), ACM (2), AAS (3). A mesma solução foi aplicada 5 vezes, na base da placa com distância de 1 cm entre cada aplicação.

As médias e os desvios padrões para os  $R_f$  e para as alturas dos picos, dos analitos separados em cinco canais da placa feita em laboratório e em cinco pontos de aplicação da placa de CCD comercial foram calculados. Para as duas placas avaliadas, o CV para o  $R_f$  ( $<5\%$ ,  $n = 5$ ) indicou boa precisão nas análises com desempenho semelhante na separação dos analitos. Já para as alturas dos picos a placa comercial apresentou coeficientes de variação maiores que do dispositivo proposto, da ordem de 1,8%, 7,5%, e 15,8% ( $n = 5$ ) estimados para CAF, ACM e AAS, respectivamente. Indicando que mesmo a placa comercial possui erros inerentes nas aplicações quantitativas, e que a placa desenvolvida em laboratório apresenta-se como uma boa opção na substituição das placas comerciais.

Para construir as curvas analíticas dos três analitos, utilizou-se as soluções padrão que foram preparadas anteriormente neste trabalho, nas faixas de concentração de CAF 0,50-2,50  $\text{mg mL}^{-1}$  ACM 0,18 a 0,45  $\text{mg mL}^{-1}$  e concentrações decrescentes de AAS 3,75 a 0,7  $\text{mg mL}^{-1}$ , para evitar a sobreposição de picos.



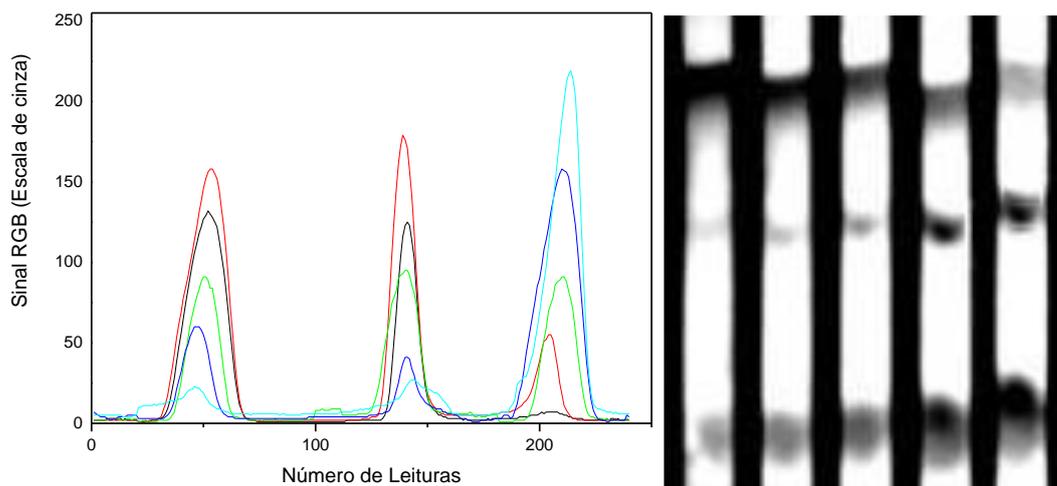
**Figura 49.** Cromatogramas (esquerda) e imagem da placa comercial de CCD (direita) para corridas com CAF (0,5 a 2,0 mg mL<sup>-1</sup>), ACM (0,18 a 0,36 mg mL<sup>-1</sup>) e AAS (0,70 a 3,00 mg mL<sup>-1</sup>) indicados pelos números 1, 2 e 3, respectivamente.

Empregando a placa de CCD comercial na separação dos analitos utilizados nesse trabalho foi possível construir as curvas analíticas com quatro pontos para cada analito. Com base no cromatograma apresentado na Figura 47. É possível inferir a saturação do sinal a partir das concentrações de 2,00 mg mL<sup>-1</sup> de CAF e 0,36 mg mL<sup>-1</sup> de ACM. Para o AAS foi observado um espalhamento lateral das bandas, indicando a sobreposição destas, fator este que dificulta as leituras pelo método proposto baseado em imagens digitais.

**Tabela 9.** Resultados para calibração e seus respectivos coeficientes de correção linear baseados nas alturas dos picos e limites de detecção estimados para as separações realizadas na placa de CCD comercial e na placa de CCD *lab-made* proposta

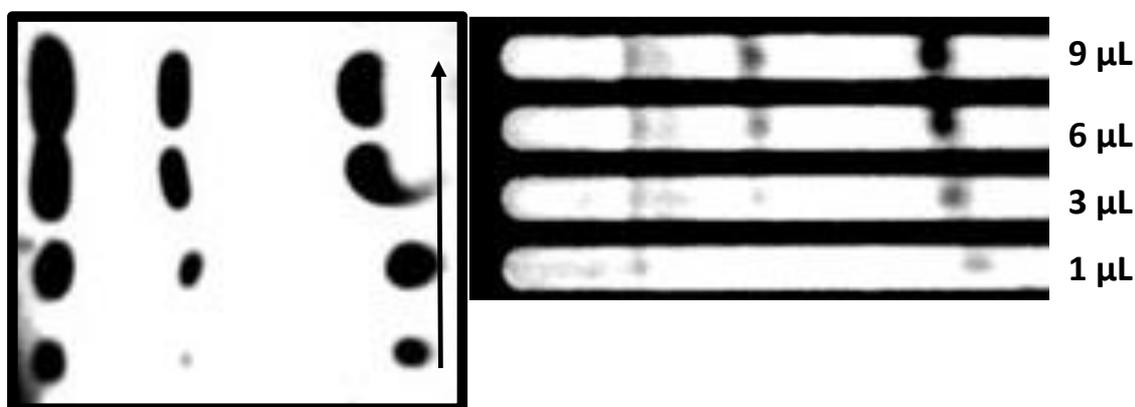
Placa de CCD Comercial	Analito	Faixa de concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R
	CAF	0,50 – 2,00	$y = 63 x + 40,5$	0,9956
ACM	0,18 – 0,36	$y = 408,9 x - 71,3$	0,9966	
AAS	0,70 – 3,00	$y = 32,9 x + 71,3$	0,9884	
Placa de CCD <i>Lab-Made</i>	Analito	Faixa de concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R
	CAF	0.50 – 2.50	$y = 68,4 x - 9,8$	0,9981
	ACM	0.18 – 0.45	$y = 454,4 x - 73,2$	0,9941
	AAS	0.70 – 3.75	$y = 69,29 x - 47.41$	0,9972

As separações cromatográficas com o dispositivo proposto permitiram a construção das curvas analíticas com boas linearidades ( $R > 0,99$ ), e boa resolução de leitura para as cinco concentrações estudadas, como pode ser observado na Figura 48. As equações e faixas de concentração são mostradas na Tabela 9. Com base nos resultados obtidos para as duas placas, é possível inferir que o desempenho das placas fabricadas em laboratório é satisfatório e altamente vantajoso, quando comparada a placa de CCD comercial, em separações de soluções mais concentradas.



**Figura 50.** Cromatogramas (esquerda) e imagem do dispositivo proposto para CCD (direita) para corridas com CAF ( $0,5$  a  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ACM ( $0,18$  a  $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e AAS ( $0,70$  a  $3,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ) indicados pelos números 1, 2 e 3, respectivamente.

Afim de avaliar a capacidade volumétrica suportada pelas placas, quantidades crescentes de solução padrão foram aplicadas na placa de CCD comercial e na placa de CCD feita em laboratório. Após as aplicações, as placas foram eluídas e as bandas foram reveladas na câmara UV como podem ser vistos na Figura 51.



**Figura 51.** Imagem da placa de CCD comercial (à esquerda) com volumes crescentes (sentido da seta) de aplicação da solução padrão. Dispositivo proposto (à direita) após separação de diferentes volumes da solução padrão aplicada ( $1 \mu\text{L}$  -  $9 \mu\text{L}$ )

A placa comercial apresentou maior sensibilidade, capaz de detectar com boa resolução volumes menores de amostra (1  $\mu\text{L}$ ). Para volumes maiores, a partir de 3  $\mu\text{L}$  as resoluções das bandas ficaram comprometidas uma vez que, ao utilizar volumes maiores ocorre um alargamento das bandas e estas aglutinam-se inviabilizando a leitura para quantificação direta da substância. O mesmo comportamento não é observado no dispositivo proposto uma vez que, os canais são individualizados e separados por uma barreira física, fato este que inviabiliza a sobreposição lateral das bandas. Assim, com o aumento do volume, há o aumento do tamanho da banda somente ao longo do canal, resultando em bandas mais largas apenas longitudinalmente possíveis de serem detectadas e quantificadas pelo sistema baseado em imagens digitais. Outra característica da placa de CCD é a possibilidade de ajustar a espessura da camada de sílica de acordo com o volume de suspensão depositado no canal. Dessa forma, camadas de sílica mais grossas suportam volumes de amostras maiores, enquanto que canais mais finos comportam apenas pequenos volumes.

### **13. CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que os suportes propostos para o desenvolvimento de placas para CCD são uma alternativa viável para a fixação do material adsorvente ao substrato, facilitando todo o procedimento. A combinação de um dispositivo com multicanais de sílica feito em laboratório e a detecção baseada em imagem digital adquirida por uma *webcam* pode ser uma alternativa eficiente e de baixo custo para realizar a separação e quantificação de fármacos por CCD com revelação no UV. A determinação do conteúdo de ACM, CAF e AAS em comprimidos demonstra uma aplicação útil da estratégia proposta que pode ser explorada para analitos adicionais no futuro.

# **CAPÍTULO 5**

Método Alternativo para CCD utilizando impressão em 3D

#### 14. ESTUDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE LEVAMISOL EM AMOSTRAS DE COCAÍNA POR CCD E DETECÇÃO POR IMAGENS DIGITAIS: UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A CONFECCÃO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO IMPRESSÃO EM 3D

Esta proposta relata o desenvolvimento de um método alternativo para a confecção de placas de baixo custo, impressas em impressora 3D que servirão como suporte para a FE em CCD. O método proposto é simples e de baixo custo e visa realizar análises quantitativas por cromatografia em camada delgada (CCD), combinada com a detecção por imagens digitais com revelação no UV.

#### 15. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a fabricação dos suportes para CCD foi utilizada uma impressora 3D *Cliever – CL 1 black edition*, abastecida com filamentos de ácido polilático (PLA), em conjunto com o *software SketchUp 2016* para o desenvolvimento do *layout*.

Foram impressos dois modelos de placas, uma com quatro e outra com seis canais. As placas de quatro canais possuem 117 mm x 54 mm x 10 mm (C x L x E), sendo que os seus canais possuem 78 mm x 5 mm x 1 mm (C x L x P) (Figura 52 A) Já a placa de seis canais tem 113 mm x 63 mm x 13 mm (C x L x E), sendo que os seus canais possuem 84mm x 6mm x 1mm (C x L x P) como mostrado na Figura 52 B.

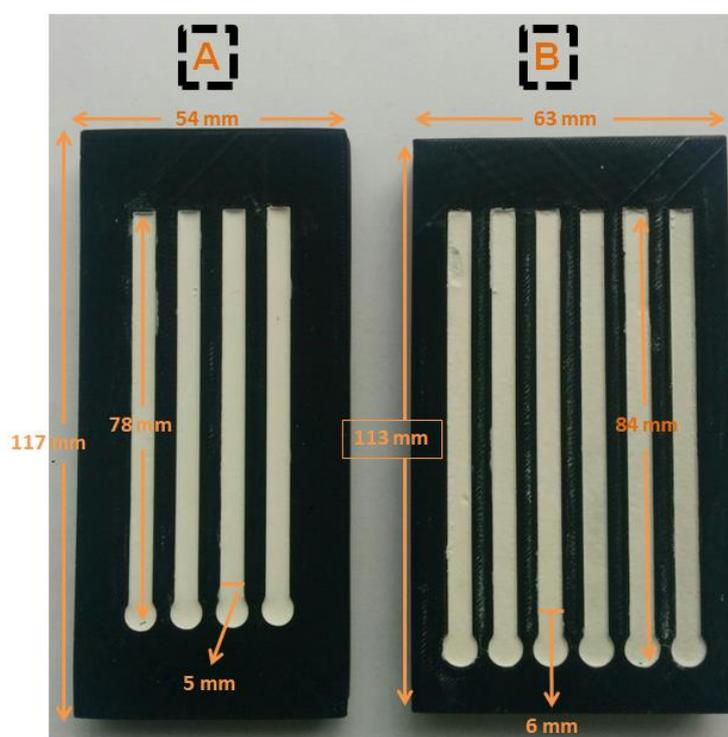
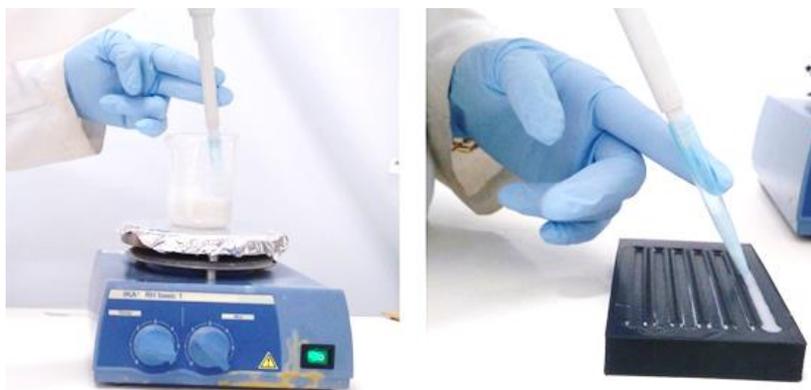


Figura 52. Suportes em PLA para CCD com quatro (A) e seis (B) canais

A sílica foi preparada com uma proporção de 5 % em massa de amido solúvel (Dinâmica) e 95 % em massa de sílica gel incorporada com revelador fluorescente 60 Hf<sub>245+366</sub> (Merck). Desse modo, cerca de 250 mg de amido eram solubilizados em 17,5 mL de água quente e, em seguida, pequenas porções de sílica foram adicionadas à solução sob agitação até que se completasse a massa total de 5 g de sílica.

Finalizada essa etapa, foram adicionadas mais duas alíquotas de 5 mL de água para se obter a suspensão desejada. É importante relatar que essa composição de sílica foi a que apresentou os melhores resultados entre outras composições avaliadas.

Em seguida, 450 µL da suspensão, mantida sob agitação constante, foram transferidos para os canais com o uso de uma micropipeta. Para evitar eventual entupimento da ponteira, o diâmetro de sua extremidade foi aumentado por meio de um corte realizado com um estilete. Após a transferência da suspensão para todos os canais, a placa foi movimentada de forma a proporcionar uma distribuição mais uniforme do sólido nos canais e imediatamente transferida para uma estufa a 70°C onde permaneceria por aproximadamente 50 minutos. A Figura 53 mostra fotografias que ilustram parte desse procedimento.



**Figura 53.** Deposição da suspensão de sílica nas placas de PLA

### ***15.1 Estudos para separação de cocaína e levamisol por CCD***

Soluções padrão de cocaína com concentrações variando entre 5 mg mL<sup>-1</sup> e 10 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas pela dissolução de massas apropriadas da droga em metanol. É importante relatar que foi utilizada a cocaína em sua forma de cloridrato, a qual foi purificada e gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal localizado em Brasília. Soluções padrão de cloridrato de levamisol na faixa de concentração de 1,0 a 10,0 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas pela dissolução da substância (Sigma-Aldrich) em metanol.

Uma solução de metanol com hidróxido de amônio, nas proporções de 99,5 % e 0,5 % (v/v) respectivamente, foi utilizada como eluente. Para as corridas, 80 mL do eluente foram transferidos para um béquer de forma alta de 500 mL cuja as paredes foram forradas com papel cromatográfico embebido no eluente.

Usualmente, volumes da ordem de 3,0  $\mu$ L da solução dos padrões eram aplicados a 2,0 cm de uma das extremidades do canal com sílica e, então, a extremidade mais próxima da aplicação era mergulhada na solução de eluente. Desse modo, cerca de 0,5 cm da sílica contida nos canais ficavam em contato com a solução, permitindo uma corrida cromatográfica em um intervalo de aproximadamente 7 minutos. Terminada a corrida, a placa foi colocada em estufa a 70 °C por cerca de 10 minutos antes da realização das medidas. A câmara de revelação UV e o programa utilizado para realização das leituras já foram descritos nas seções 7.3 e 7.4 respectivamente.

## **16. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***16.1 Avaliação preliminar dos suportes para CCD fabricados em impressora 3D***

Considerando a CCD, os suportes mostrados na Figura 52 se mostraram uma alternativa eficiente e de baixo custo para a deposição da fase estacionária de maneira uniforme sem a necessidade de espalhamento controlado da suspensão sobre uma superfície. Uma limitação importante do suporte proposto, além da falta de inercia a solventes orgânicos, está na baixa resistência do PLA a temperaturas elevadas, o que inviabiliza o procedimento de ativação.

De fato a literatura mostra que a sílica é ativada em temperaturas superiores a 110 °C e o PLA apresenta uma temperatura de transição vítrea (TG) de 60 °C,<sup>108</sup> de modo que em temperaturas superiores a TG haverá deformação do molde que poderá afetar a estrutura da placa e dos canais. Apesar disso a literatura mostra que algumas separações cromatográficas podem ser realizadas sem a ativação da sílica e, por esse motivo continuou-se a avaliar o dispositivo proposto.

Outra constatação importante observada durante o trabalho foi a influência da composição da sílica na aderência ao suporte PLA. Mesmo suspendendo a sílica 60 G (Merk) em diferentes proporções em água o sólido adsorvente apresentou baixa adesão ao suporte, não sendo possível a realização da corrida cromatográfica vertical. Por esse motivo o desenvolvimento cromatográfico com essa fase sólida limitou-se a corridas horizontais.

Considerando esse aspecto, buscou-se alternativas para melhorar a fixação da sílica ao suporte. Desse modo, utilizando-se o procedimento descrito na seção 15, onde foi realizada a mistura da sílica com amido e obteve-se um desempenho plenamente adequado para o desenvolvimento de corridas ascendentes.

Observou-se que, até mesmo a sílica que permanece em contato direto com a solução do eluente não foi removida do suporte, possibilitando o seu uso. Além disso notou-se que o processo de deposição possibilitou que todos os canais do mesmo suporte apresentassem velocidades de corrida semelhantes. Como mostra a Figura 54, a frente do solvente se encontra em posições similares nas fases estacionárias após 5 minutos do início da corrida, o que pode indicar uma boa repetibilidade do processo de fabricação das placas cromatográficas.



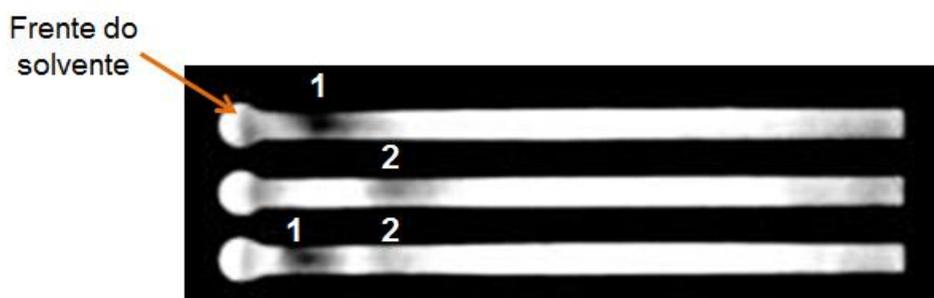
**Figura 54.** Placa de CCD com 5 minutos de eluição.

Avaliando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os suportes em PLA apresentaram limitações que podem dificultar a aplicação para algumas separações cromatográficas por CCD. Nesse sentido, encontra-se em fase de desenvolvimento um suporte a base de alumínio que deverá superar muitas destas limitações.

### ***16.2 Estudos para separação de cocaína e levamisol por CCD***

A Figura 55 mostra a imagem de uma corrida cromatográfica realizada com a sílica depositada em suporte de PLA com padrões de Levamisol ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), cocaína ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e também para a mistura das substâncias com mesma concentração dos padrões. O método utilizado na revelação faz uso de uma sílica fluorescente que responde ao

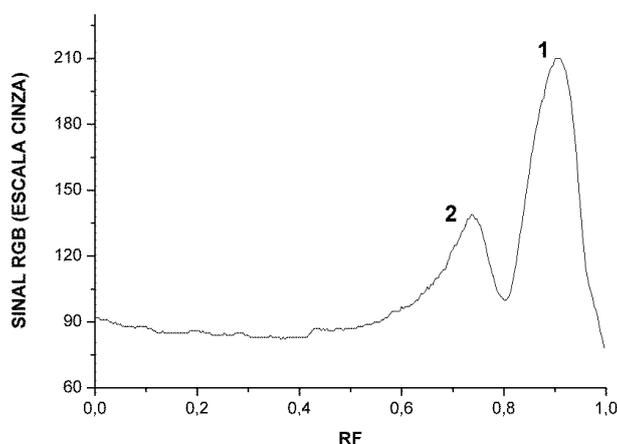
comprimento de onda de 254 nm. Quando a placa é inserida na caixa reveladora, a sílica é vista emitindo luz branca enquanto que a cocaína e o levamisol são detectados por meio de bandas escuras, uma vez que a imagem foi ajustada para escala de cinza. Como pode ser observado, a separação das substâncias ocorre de maneira satisfatória podendo-se distinguir com boa nitidez as bandas características para o levamisol e para a cocaína.



**Figura 55.** Imagem da placa de CCD proposta após a separação de levamisol (1) e cocaína (2). Os dois primeiros canais referem-se às corridas dos padrões puros e o último canal refere-se a corrida para mistura dos padrões.

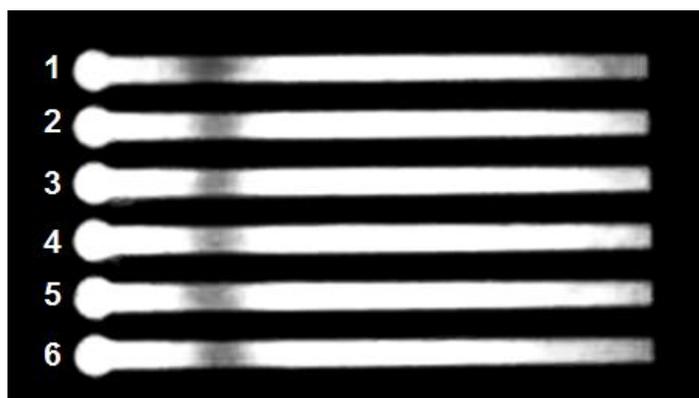
A Figura 56 traz o cromatograma obtido para a corrida realizada para a mistura das substâncias mostrada no último canal da imagem Figura 55. Como pode ser observado, a estratégia baseada em imagem digital com escala de cinza permite distinguir os picos para o levamisol e cocaína com  $R_f$  estimados em 0,90 e 0,74 respectivamente. Observa-se também uma razão sinal/ruído adequada para as condições propostas.

Apesar destas constatações, nota-se no registro que não há uma separação completa das substâncias, o que pode ser verificado pela presença de um sinal acima do sinal da linha de base entre os picos cromatográficos. Uma estratégia para contornar esse problema é otimizar o volume de aplicação da amostra, assim como a concentração das substâncias que, sabidamente, causam o alargamento das bandas.

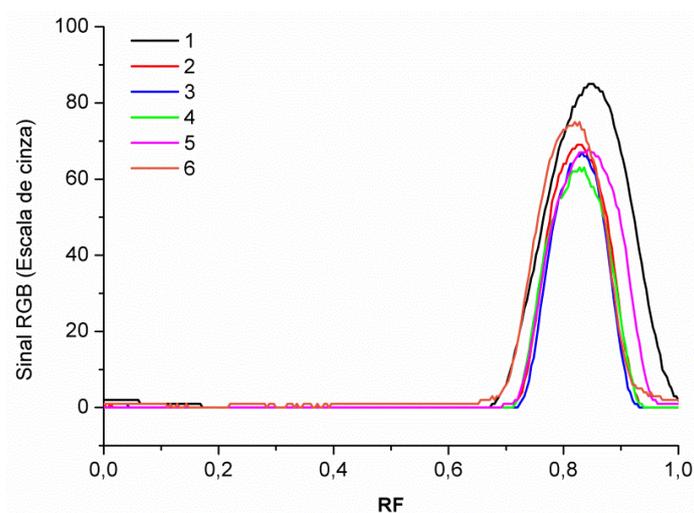


**Figura 56.** Cromatograma obtido para a separação de uma mistura de levamisol 5 mg mL<sup>-1</sup> (1) e cocaína 10 mg mL<sup>-1</sup> (2).

Utilizando a placa com seis canais realizou-se corridas cromatográficas com o mesmo padrão de levamisol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 57) com o objetivo de avaliar a repetibilidade de todo o processo, desde a fabricação do dispositivo até a detecção do sinal analítico. A Figura 57 mostra as bandas cromatográficas obtidas indicando um desempenho similar para todos os canais avaliados. Com base nos cromatogramas apresentados na Figura 58, estimou-se os valores de  $R_f$  para os picos e as suas respectivas áreas. A Tabela 10 lista os valores encontrados acompanhados das médias e dos desvios padrões.



**Figura 57.** Imagem da placa de CCD proposta após a corrida com levamisol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ .



**Figura 58.** Cromatogramas obtidos após a corrida com levamisol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**Tabela 10.** Resultados encontrados para as corridas com levamisol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

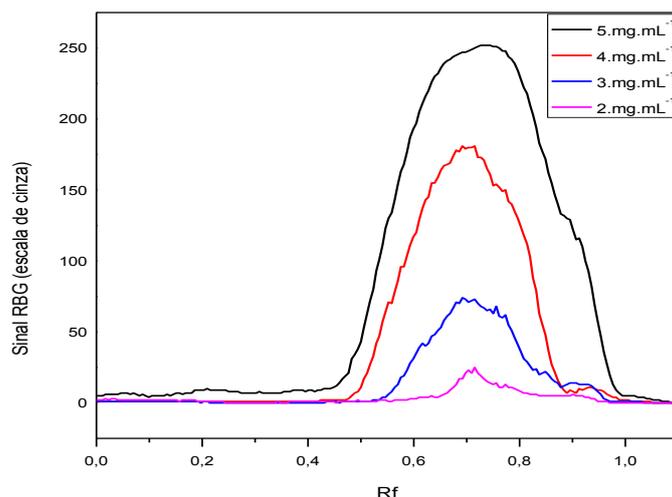
Pico	Área	Rf
1	12,8	0,85
2	7,3	0,83
3	6,6	0,83
4	6,9	0,83
5	8,6	0,84
6	8,9	0,82
Média	9,1	0,83
Desvio padrão	2,1	0,01
CV(%)	23,1	1,2

Como pode ser observado os valores de  $R_f$  variaram pouco, sendo obtido, um valor médio de 0,83 com precisão, estimada pelo coeficiente de variação, de apenas 1,2 %, o que mostra que o procedimento é bastante reprodutível no que se refere ao  $R_f$ . Entretanto, a precisão para as medidas de área variou mais ( $CV = 23,1 \%$ ) o que certamente pode afetar as medidas quantitativas. Apesar disso, aplicando-se o teste Q aos dados de área, foi constatado que o valor para o pico 1 é anômalo, de modo que, com a exclusão desse valor, obtêm-se uma área média de 7,7 com desvio padrão de 1,0; fazendo com que o coeficiente de variação seja estimado em 13,0 %. Pode-se afirmar que este valor de precisão para a área é aceitável para aplicações semi-quantitativas, porém acredita-se que melhorias na aplicação dos padrões e na uniformidade da iluminação da câmara relevadora possam tornar a técnica quantitativa.

Em outro estudo, procurou-se construir curvas analíticas realizando corridas com diferentes concentrações de Levamisol ( $2-5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Conforme ilustra a Figura 59 houve variações significativas nas intensidades da escala de cinza, aumentando gradativamente com o aumento da concentração e na Figura 60 observa-se o aumento gradual na intensidade dos picos dos padrões com concentrações entre  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , sendo que a resposta para o padrão com  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  quase atingiu o máximo em Y (255), indicando uma possível saturação do sinal para concentrações maiores que  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Esse ensaio foi realizado em triplicata, sendo observados comportamentos similares.



**Figura 59** Imagem da placa de CCD após a corrida com os padrões de Levamisol de 2 - 5  $\text{mg mL}^{-1}$ .



**Figura 60.** Cromatogramas obtidos após a corrida com Levamisol variando as concentrações de 2 a 5 mg mL<sup>-1</sup>.

Com os sinais analíticos obtidos para os quatro padrões avaliados, construiu-se duas curvas analíticas, sendo uma baseada nas áreas dos picos (Figura 61) e a outra baseada nas alturas dos picos (Figura 62), empregando-se os valores listados na Tabela 11. Os coeficientes de quantificação encontrados com base na área do pico foram de  $R^2 = 0,9918$  e com base na altura do pico  $R^2 = 0,9926$  indicando uma tendência linear dos dados, porém uma avaliação mais criteriosa, com maior número de padrões, deverá ser realizada para se estimar o potencial de aplicação da técnica proposta na determinação quantitativa do Levamisol. Com esses resultados pode-se afirmar que o método proposto apresenta um elevado potencial para aplicação na determinação de Levamisol em amostras de cocaína. Entretanto estudos com outros adulterantes além do Levamisol deverão ser realizados para que seja melhor avaliado o uso dos dispositivos propostos.

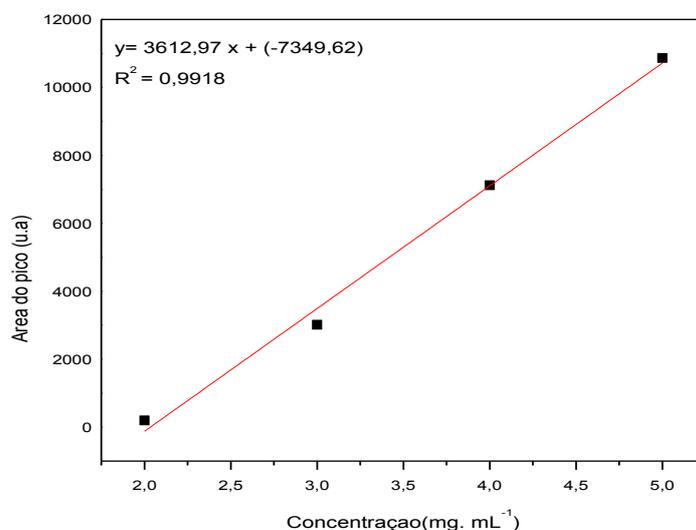
É importante relatar que embora não tenha sido mostrado nas Figura 59 e Figura 60, a corrida obtida para aplicação da solução do branco não apresenta uma banda cromatográfica em escala de cinza na imagem, tampouco um pico detectável, de forma que o sinal para essa condição consiste basicamente em uma linha de base com variações ao redor do valor zero (sinal RGB). Considerando esse comportamento, estimou-se o limite de detecção apenas com base na curva analítica construída com as alturas dos picos, utilizando como sinal analítico mínimo detectável a média para o sinal da linha de base somada à três vezes o valor de seu desvio padrão. A partir dessa estratégia obteve-se o LD de 1,85 mg mL<sup>-1</sup> e o LQ de 5,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Com esses resultados pode-se afirmar que o método proposto apresenta um elevado potencial para aplicação na determinação de Levamisol em amostras de cocaína.

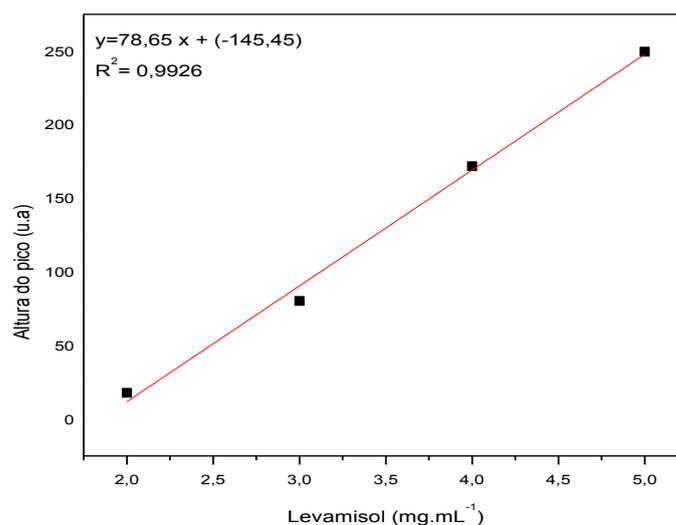
Entretanto, estudos com outros adulterantes além do Levamisol deverão ser realizados para que seja melhor avaliado o uso dos dispositivos propostos.

**Tabela 11.** Valores de área e altura encontrados para os picos cromatográficos apresentados na Figura 61 e Figura 62

Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Área x 10 <sup>2</sup> (u.a)	Altura do Pico (u.a)
2	1,92	17,89
3	30,07	80,14
4	71,18	171,76
5	109	249,52



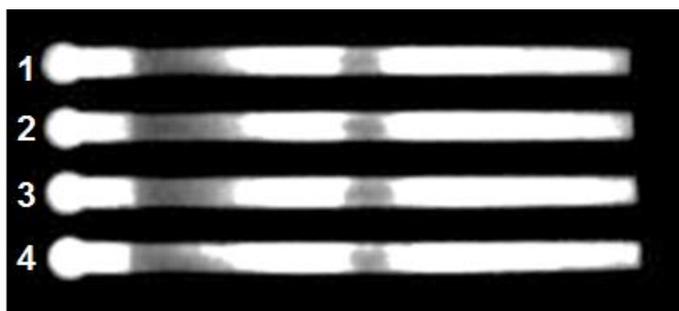
**Figura 61.** Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores de área apresentados na Tabela 11.



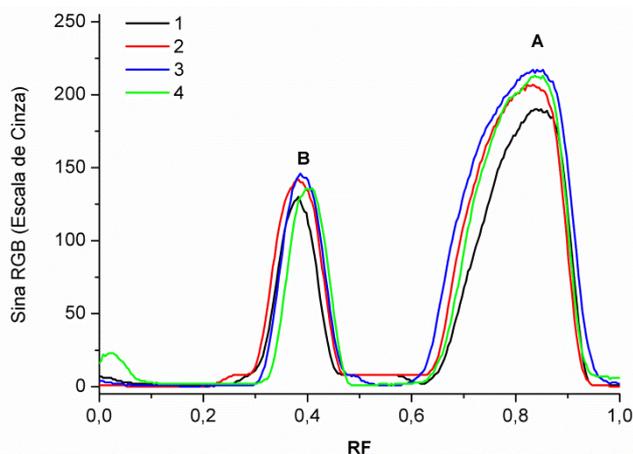
**Figura 62.** Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores da altura do pico apresentados na Tabela 11.

A Figura 63 mostra uma fotografia para a separação de Cocaína base e Levamisol empregando-se uma placa com quatro canais, vale lembrar que os estudos mostrados na Figura 55 foram conduzidos com cocaína cloridrato. Como pode ser observado, a corrida com cocaína base e levamisol apresenta duas bandas cromatográficas, sendo uma delas possivelmente referente a cocaína, mais próxima do local de aplicação da amostra, e outra constituída por uma mistura de Levamisol com alguma impureza presente na amostra de cocaína analisada.

De fato, o perfil de corrida obtido para aplicação de uma amostra contendo apenas cocaína base apresenta duas bandas similares à observada para a mistura de cocaína base com levamisol. Esse comportamento pode ter sido observado devido a uma possível ineficiência no processo de purificação da cocaína base pelo Instituto Nacional de Criminalística, porém isso deverá ser melhor investigado. De qualquer forma, em confirmando-se esse resultado poderá se obter uma resposta significativamente diferente para amostras de cocaína base e de cocaína cloridrato.



**Figura 63.** Imagem da placa de CCD proposta após a corrida para mistura de levamisol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  e cocaína  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ .



**Figura 64.** Cromatogramas obtidos para a separação de Cocaína base do Levamisol empregando-se uma placa com quatro canais.

Por fim, constatou-se um bom desempenho em termos de  $R_f$  e de áreas dos picos para a mistura com cocaína base e levamisol, sendo obtidos resultados semelhantes aos já destacados no início dessa seção. A Tabela 12 lista os valores obtidos.

**Tabela 12.** Valores de,  $R_f$ , áreas dos picos, média, desvio padrão e CV (%) para a separação de Cocaína base do Levamisol.

Pico	Área Banda A	Área Banda B	$R_f$ Banda A	$R_f$ Banda B
1	37,7	11,5	0,84	0,38
2	44,9	13,5	0,83	0,38
3	38,1	14,3	0,84	0,39
4	33,2	10,7	0,84	0,40
Média	38,5	12,5	0,84	0,39
Desvio padrão	4,8	17,0	0,01	0,01
CV (%)	12,6	13,6	1,2	2,6

## **17. CONCLUSÃO**

Conclui-se que os dispositivos propostos para o desenvolvimento de CCD são uma alternativa viável para a fixação do material adsorvente ao substrato, facilitando todo o procedimento. Apesar disso, substratos em PLA não são inertes a muitos solventes, de modo que, outros materiais foram avaliados para sua substituição, e melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se alumínio para a fabricação dos suportes.

As análises cromatográficas realizadas indicaram um desempenho satisfatório dos dispositivos para CCD e também do sistema de detecção baseado em imagens digitais com revelação por UV. Embora os resultados obtidos para a separação e quantificação de levamisol sejam ainda preliminares, pode-se afirmar que a estratégia proposta apresenta uma boa perspectiva para aplicação em amostras apreendidas de cocaína, com possibilidade de fornecer informações mais apuradas sobre esse material, de maneira simples, rápida e com baixo custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Cazes, J. *Encyclopedia of Chromatography*, Second edi.; PRESS, C., Ed.; CRC Press, 2005.
- (2) Morlock, G.; Schwack, W. Hyphenations in Planar Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (43), 6600–6609.
- (3) Oliveira, Gislei; Silva, F. Cromatografia Em Papel: Reflexão Sobre Uma Atividade Experimental Para Discussão Do Conceito de Cromatografia. *Quím.nova esc* **2017**, *39* (2), 162–169.
- (4) Cecchi, H. M. *Fundamentos Teóricos e Práticos Em Análise de Alimentos*, 2nd ed.; Unicamp, E., Ed.; 2003.
- (5) Fraceto, F.L; Lima, L. S. Aplicação Da Cromatografia Em Papel Na Separação de Corantes Em Pastilhas de Chocolate. *Quim. Nov. na Esc.* **2003**, *18*, 46–48.
- (6) Meyer, V. R. CHROMATOGRAPHY | Overview ☆ BT - Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering; Elsevier, 2013.
- (7) Mroczek, T. Qualitative and Quantitative Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography/High Performance Liquid Chromatography/Diode-Array/Electrospray-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry of Cholinesterase Inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129* (Supplement C), 155–162.
- (8) 8 Thin-Layer Chromatography. In *Chromatography and Separation Science*; Ahuja, S. B. T.-S. S. and T., Ed.; Academic Press, 2003; Vol. 4, pp 113–131.
- (9) Rabel, F.; Sherma Molecular Sciences and Chemical Engineering, J. B. T.-R. M. in C. Thin-Layer Chromatography—Plate Technology ☆; Elsevier, 2018.
- (10) Soponar, F.; Moț, A. C.; Sârbu, C. Quantitative Determination of Some Food Dyes Using Digital Processing of Images Obtained by Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1188* (2), 295–300.
- (11) Yu, H.; Le, H. M.; Kaale, E.; Long, K. D.; Layloff, T.; Lumetta, S. S.; Cunningham, B. T. Characterization of Drug Authenticity Using Thin-Layer Chromatography Imaging with a Mobile Phone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *125*, 85–93.
- (12) Pessoa, K. D.; Suarez, W. T.; dos Reis, M. F.; de Oliveira Krambeck Franco, M.; Moreira, R. P. L.; dos Santos, V. B. A Digital Image Method of Spot Tests for Determination of Copper in Sugar Cane Spirits. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *185*, 310–316.
- (13) Soares, S.; Lima, M. J. A.; Rocha, F. R. P. A Spot Test for Iodine Value Determination in Biodiesel Based on Digital Images Exploiting a Smartphone. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 195–199.
- (14) SILVA NETO, Gerson F.; FONSECA, Alexandre; BRAGA, J. W. B.

CLASSIFICAÇÃO DE ÁGUAS MINERAIS BASEADA EM IMAGENS DIGITAIS OBTIDAS POR SMARTPHONES. *Quím. Nov.* **2016**, 39 (7), 876–881.

- (15) Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J. Recent Developments in Computer Vision-Based Analytical Chemistry: A Tutorial Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 899 (Supplement C), 23–56.
- (16) Gunther Wyszecki, W. S. *Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*, Second.; Wiley Classics Library, Ed.; Denver, 2000.
- (17) Sereshti, H.; Poursorkh, Z.; Aliakbarzadeh, G.; Zarre, S.; Ataolahi, S. An Image Analysis of TLC Patterns for Quality Control of Saffron Based on Soil Salinity Effect: A Strategy for Data (Pre)-Processing. *Food Chem.* **2018**, 239 (Supplement C), 831–839.
- (18) Ristivojević, P.; Trifković, J.; Vovk, I.; Milojković-Opsenica, D. Comparative Study of Different Approaches for Multivariate Image Analysis in HPTLC Fingerprinting of Natural Products Such as Plant Resin. *Talanta* **2017**, 162 (Supplement C), 72–79.
- (19) Cimpoiu, C.; Hodisan, S. Quantitative Thin Layer Chromatography Analysis by Photodensitometry. *Rev. Anal. Chem.* **2002**, 21 (1), 55–75.
- (20) Bernard-Savary, P.; Poole, C. F. Instrument Platforms for Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1421 (Supplement C), 184–202.
- (21) Pacheco, S.\*; Borguini, R. G.; Santiago, M. C. P. A.; Nascimento, L. S. M. .; Godoy, R. L. O. História Da Cromatografia Líquida. *Rev. Virtual Química* **2015**, 7 (14), 1225–1271.
- (22) COLLINS, C. H. I. Michael Tswett e o “Nascimento” Da Cromatografia. *Sci. Chromatogr.* **2009**, 1 (1), 7–20.
- (23) Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases: A Theory of Chromatography. 2. Application to the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins. *Biochem. J.* **1941**, 35 (12), 1358.
- (24) Hałka-Grysińska, A.; Gwarda, R. Ł.; Dzido, T. H. Chapter 4 - Planar Chromatography Using Electroosmotic Flow A2 - Tyihák, Ernő BT - Forced-Flow Layer Chromatography; Elsevier: Boston, 2016; pp 223–283.
- (25) COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*; UNICAMP, E. da, Ed.; Campinas, SP, 2006.
- (26) Touchstone, J. C. History of Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1993**, 16 (8), 1647–1665.
- (27) Almeida, M. I. G. S.; Jayawardane, B. M.; Kolev, S. D.; McKelvie, I. D. Developments of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) for Water Analysis: A Review. *Talanta* **2017**.

- (28) Carvalho, W; Canilha, L.; Ferraz, A; Milagres, A. M. F. . Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação Da Madeira. *Quim. Nov.* **2009**, 32 (8), 2191–2195.
- (29) Radler, F.; Nunes, D. *CROMATOGRAFIA - Princípios Básicos e Técnicas Afins*, 1st ed.; Editora Interciência, Ed.; 2003.
- (30) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, 442 (7101), 368–373.
- (31) Wilson, I. D. CHROMATOGRAPHY | Paper Chromatography; Wilson, I. D. B. T.-E. of S. S., Ed.; Academic Press: Oxford, 2000; pp 397–404.
- (32) Carol H. Collins, Gilberto L. Braga, P. S. B. *Introducao a Metodos Cromatograficos*, 7th ed.; Unicamp, E., Ed.; 1997.
- (33) Zhang, K.; Qing, J.; Gao, H.; Ji, J.; Liu, B. Coupling Shell-Isolated Nanoparticle Enhanced Raman Spectroscopy with Paper Chromatography for Multi-Components on-Site Analysis. *Talanta* **2017**, 162, 52–56.
- (34) Li, H.; Qiu, T.; Cao, Y.; Yang, J.; Huang, Z. Pre-Staining Paper Chromatography Method for Quantification of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (25), 5057–5060.
- (35) Liu, W.; Kou, J.; Xing, H.; Li, B. Paper-Based Chromatographic Chemiluminescence Chip for the Detection of Dichlorvos in Vegetables. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 52 (Supplement C), 76–81.
- (36) van Reenen, A.; Berger, M.; Moreau, E.; Bekx, E.; Bruinink, T.; Kemper, D.; van Lippen, L.; Weusten, J.; Mrakovic, A.; Michielsen, E.; et al. Analytical Performance of a Single Epitope B-Type Natriuretic Peptide Sandwich Immunoassay on the Minicare Platform for Point-of-Care Diagnostics. *Pract. Lab. Med.* **2019**, 15, e00119.
- (37) Tan, E. K. W.; Au, Y. Z.; Moghaddam, G. K.; Occhipinti, L. G.; Lowe, C. R. Towards Closed-Loop Integration of Point-of-Care Technologies. *Trends Biotechnol.* **2019**, 37 (7), 775–788.
- (38) Oyaert, M.; Van Maerken, T.; Bridts, S.; Van Loon, S.; Laverge, H.; Stove, V. Analytical and Pre-Analytical Performance Characteristics of a Novel Cartridge-Type Blood Gas Analyzer for Point-of-Care and Laboratory Testing. *Clin. Biochem.* **2018**, 53, 116–126.
- (39) Poole, C. F. Thin-Layer Chromatography: Challenges and Opportunities. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000 (1), 963–984.
- (40) Ribarova, F. Chapter 10 - Amino Acids: Carriers of Nutritional and Biological Value Foods. In *Handbook of Food Bioengineering*; Grumezescu, A. M., Holban, A. M. B. T.-F. P. for I. Q. and C., Eds.; Academic Press, 2018; pp 287–311.
- (41) Cheng, S.-C.; Bhat, S. M.; Lee, C.-W.; Shiea, J. Thin Layer Chromatography Combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Characterizing

Herbal Compounds. *Int. J. Mass Spectrom.* **2018**, *434*, 264–271.

- (42) Bayona, L. M.; Verpoorte, R.; Klinkhamer, P. G. L.; Choi, Y. H. Thin-Layer Chromatography | Metabolomics. In *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*; Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M., Eds.; Academic Press: Oxford, 2019; pp 59–75.
- (43) Ferenczi-Fodor, K.; Végh, Z.; Renger, B. Thin-Layer Chromatography in Testing the Purity of Pharmaceuticals. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25* (8), 778–789.
- (44) Berezkin, V. G. Contributions from NA Izmailov and MS Schraiber to the Development of Thin-Layer Chromatography (On the 70th Anniversary of the Publication of the First Paper on Thin-Layer Chromatography). *J. Anal. Chem.* **2008**, *63* (4), 400–404.
- (45) Stahl, E. *Neue Anwendungsgebiete Der Dünnschicht-Chromatographie*; 1961; Vol. 73.
- (46) Bolliger, H. R.; Brenner, M.; Gänshirt, H.; Mangold, H. K.; Seiler, H.; Stahl, E.; Waldi, D. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*; Springer, 1965.
- (47) Foust, Alan S. et al. *Princípios de Operações Unitárias*, 2 ed.; Guanabara dois, Ed.; Rio de Janeiro, 1982.
- (48) Reynaldo Gomide. *Operações Unitárias Vo. 3 Separações Mecânicas*, 1st ed.; São Paulo, 1980.
- (49) Ruthven, D. M. *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*; John Wiley & Sons, 1984.
- (50) Adamson, A. W.; Gast, A. P. *Physical Chemistry of Surfaces*; Interscience New York, 1967; Vol. 15.
- (51) Do, D. D. *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*; Imperial college press London, 1998; Vol. 2.
- (52) Putra, E. K.; Pranowo, R.; Sunarso, J.; Indraswati, N.; Ismadji, S. Performance of Activated Carbon and Bentonite for Adsorption of Amoxicillin from Wastewater: Mechanisms, Isotherms and Kinetics. *Water Res.* **2009**, *43* (9), 2419–2430.
- (53) Cooney, D. O. *Adsorption Design for Wastewater Treatment*; CRC press, 1998.
- (54) Sigma-Aldrich. No Title  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/60778?lang=en&region=US>  
(accessed Oct 16, 2018).
- (55) Poole, C. F. Chapter 1 - Milestones, Core Concepts, and Contrasts; Poole, C. F. B. T.-I. T.-L. C., Ed.; Elsevier: Boston, 2015; pp 1–29.
- (56) Geiss, F. *Fundamentals of Thin Layer Chromatography*. **1987**.
- (57) Bernard-Savary, P.; Poole, C. F. *Instrument Platforms for Thin-Layer*

Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015.

- (58) Miller, J. M. *Chromatography: Concepts and Contrasts*; John Wiley & Sons, 2005.
- (59) Santiago, M.; Strobel, S. Chapter Twenty-Four - Thin Layer Chromatography. In *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*; Lorsch, J. B. T.-M. in E., Ed.; Academic Press, 2013; Vol. 533, pp 303–324.
- (60) de Alvarenga, E. S.; Saliba, W. A.; Milagres, B. G. Montagem de Câmara Com Lâmpada de Ultravioleta de Baixo Custo. *Quim. Nova* **2005**, 28 (5), 927.
- (61) Poole, C. F. *The Essence of Chromatography*; Elsevier, 2003.
- (62) Weins, B. S. C. F. P. C. *Quantitative Thin-Layer Chromatography A Practical Survey*; 2011.
- (63) Ristivojević, P.; Morlock, G. E. High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Pattern Recognition Techniques as Tool to Distinguish Thickening Agents. *Food Hydrocoll.* **2017**, 64 (Supplement C), 78–84.
- (64) Winter, G. T.; Wilhide, J. A.; LaCourse, W. R. Analysis of Hop Acids by Thin-Layer Chromatography and the Molecular Ionization Desorption Analysis Source (MIDAS) for Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**.
- (65) Li, Y.; Wang, J.; Zhan, L.; Wleklinski, M.; Wang, J.; Xiong, C.; Liu, H.; Zhou, Y.; Nie, Z. The Bridge between Thin Layer Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: The Realization of Liquid Thin Layer Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1460 (Supplement C), 181–189.
- (66) Zhang, B. bin; Shi, Y.; Chen, H.; Zhu, Q. xia; Lu, F.; Li, Y. wei. A Separable Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Modified with MIL-101 for Detection of Overlapping and Invisible Compounds after Thin-Layer Chromatography Development. *Anal. Chim. Acta*.
- (67) Automation Technologies for Chemistry. No Title <http://www.auteclab.com.br/camag-tlc-scanner-4> (accessed Oct 17, 2017).
- (68) Stroka, J.; Spangenberg, B.; Anklam, E. New Approaches in TLC-Densitometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, 25 (10–11), 1497–1513.
- (69) Nyiredy, S. Progress in Forced-Flow Planar Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000 (1), 985–999.
- (70) Ledley, R. S. High-Speed Automatic Analysis of Biomedical Pictures. *Science* (80- . ). **1964**, 146 (3641), 216–223.
- (71) Simpkins, K. C. A Textbook of Radiology and Imaging. *Clin. Radiol.* **1981**, 32 (3), 296.
- (72) Diniz, J. R.; Correa, J. R.; Moreira, D. de A.; Fontenele, R. S.; de Oliveira, A. L.; Abdelnur, P. V; Dutra, J. D. L.; Freire, R. O.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D.

- Water-Soluble Tb<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> Complexes with Ionophilic (Ionically Tagged) Ligands as Fluorescence Imaging Probes. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (17), 10199–10205.
- (73) Espírito-Santo, F. D. B.; Shimabukuro, Y. E.; Aragão, L.; Machado, E. L. M. Análise Da Composição Florística e Fitossociológica Da Floresta Nacional Do Tapajós Com o Apoio Geográfico de Imagens de Satélites. *Acta Amaz.* **2005**, 35 (2), 155–173.
- (74) E. ANUTA, P. Spatial Registration of Multispectral and Multitemporal Digital Imagery Using Fast Fourier Transform Techniques. *Geosci. Electron. IEEE Trans.* **1970**, 8, 353–368.
- (75) Gonzalez, R. C.; Woods, R. E. *Processamento Digital De Imagens*; ADDISON WESLEY BRA.
- (76) Jain, A. K. *Fundamentals of Digital Image Processing*; Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1989.
- (77) Fichou, D.; Morlock, G. E. QuanTLC, an Online Open-Source Solution for Videodensitometric Quantification. *J. Chromatogr. A.*
- (78) Jayaraman, S; Esakkirajan, S; Veerakumar, T. *Digital Image Processing*, 1st ed.; Tata McGraw Hill Education: New Delhi, 2009.
- (79) Jähne, B. *Digital Image Processing*; EngineeringPro collection; Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- (80) Terras, M. M. *Digital Images for the Information Professional*; Digital Research in the Arts and Humanities; Routledge, 2016.
- (81) Nakamura, J. *Image Sensors and Signal Processing for Digital Still Cameras*; Optical Science and Engineering; CRC Press, 2017.
- (82) Kang, M. G. *Selected Papers on CCD and CMOS Imagers*; SPIE milestone series; SPIE Press, 2003.
- (83) Ohta, J. *Smart CMOS Image Sensors and Applications*; Optical Science and Engineering; CRC Press LLC, 2007.
- (84) Morbioli, G. G.; Mazzu-Nascimento, T.; Stockton, A. M.; Carrilho, E. Technical Aspects and Challenges of Colorimetric Detection with Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) - A Review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 970 (Supplement C), 1–22.
- (85) Momeni, N.; Ramanathan, K.; Larsson, P.-O.; Danielsson, B.; Bengmark, S.; Khayyami, M. CCD-Camera Based Capillary Chemiluminescent Detection of Retinol Binding Protein. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 387 (1), 21–27.
- (86) Byrne, L.; Barker, J.; Pennarun-Thomas, G.; Diamond, D.; Edwards, S. Digital Imaging as a Detector for Generic Analytical Measurements. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2000**, 19 (8), 517–522.

- (87) Gupta, S.; Girshick, R.; Arbeláez, P.; Malik, J. Learning Rich Features from RGB-D Images for Object Detection and Segmentation. In *European Conference on Computer Vision*; Springer, 2014; pp 345–360.
- (88) Peng, B.; Chen, G.; Li, K.; Zhou, M.; Zhang, J.; Zhao, S. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Digital Image Colorimetric Analysis for Detection of Total Iron in Water and Food Samples. *Food Chem.* **2017**, *230* (Supplement C), 667–672.
- (89) Shahvar, A.; Saraji, M.; Shamsaei, D. Smartphone-Based Chemiluminescence Sensing for TLC Imaging. *Sensors Actuators B Chem.* **2017**.
- (90) No Title.
- (91) Krakowska, B.; Custers, D.; Deconinck, E.; Daszykowski, M. Chemometrics and the Identification of Counterfeit Medicines—A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *127* (Supplement C), 112–122.
- (92) Rebiere, H.; Guinot, P.; Chauvey, D.; Brenier, C. Fighting Falsified Medicines: The Analytical Approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *142* (Supplement C), 286–306.
- (93) Marcelo, M. C. A.; Mariotti, K. C.; Ortiz, R. S.; Ferrão, M. F.; Anzanello, M. J. Scott Test Evaluation by Multivariate Image Analysis in Cocaine Samples. *Microchem. J.* **2016**, *127* (Supplement C), 87–93.
- (94) De Carvalho, T. C.; Tosato, F.; Souza, L. M.; Santos, H.; Merlo, B. B.; Ortiz, R. S.; Rodrigues, R. R. T.; Filgueiras, P. R.; França, H. S.; Augusti, R.; et al. Thin Layer Chromatography Coupled to Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Cocaine and Its Adulterants Analysis. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *262* (Supplement C), 56–65.
- (95) Akar, Z.; Burnaz, N. A. A New Colorimetric Method for CUPRAC Assay with Using of TLC Plate. *LWT* **2019**, *112*, 108212.
- (96) Dawan, P.; Satarpai, T.; Tuchinda, P.; Shiowatana, J.; Siripinyanond, A. A Simple Analytical Platform Based on Thin-Layer Chromatography Coupled with Paper-Based Analytical Device for Determination of Total Capsaicinoids in Chilli Samples. *Talanta* **2017**, *162*, 460–465.
- (97) Sherma, T. H. and J. USE OF THE CHROMIMAGE FLATBED SCANNER FOR QUANTIFICATION OF HIGH-PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAMS IN THE VISIBLE AND FLUORESCENCE-QUENCHING MODES. *ACTA Chromatogr.* **2006**, *1* (17), 250–260.
- (98) Morlock, G. E. Miniaturized Planar Chromatography Using Office Peripherals — Office Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1382* (Supplement C), 87–96.
- (99) Shahvar, A.; Saraji, M.; Shamsaei, D. Smartphone-Based Chemiluminescence Sensing for TLC Imaging. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *255*, 891–894.
- (100) Lancaster, M.; Goodall, D. M.; Bergström, E. T.; McCrossen, S.; Myers, P. Real-

- Time Image Acquisition for Absorbance Detection and Quantification in Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (3), 905–911.
- (101) Phattanawasin, P.; Sotanaphun, U.; Sukwattanasinit, T.; Akkarawaranthorn, J.; Kitchaiya, S. Quantitative Determination of Sibutramine in Adulterated Herbal Slimming Formulations by TLC-Image Analysis Method. *Forensic Sci. Int.* **2012**, 219 (1), 96–100.
- (102) Li, L.; Liu, Z.; Zhang, H.; Yue, W.; Li, C.-W.; Yi, C. A Point-of-Need Enzyme Linked Aptamer Assay for Mycobacterium Tuberculosis Detection Using a Smartphone. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, 254, 337–346.
- (103) Zhang, W.; Niu, X.; Li, X.; He, Y.; Song, H.; Peng, Y.; Pan, J.; Qiu, F.; Zhao, H.; Lan, M. A Smartphone-Integrated Ready-to-Use Paper-Based Sensor with Mesoporous Carbon-Dispersed Pd Nanoparticles as a Highly Active Peroxidase Mimic for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, 265, 412–420.
- (104) Sima (Tuhuțiu), I. A.; Casoni, D.; Sârbu, C. High Sensitive and Selective HPTLC Method Assisted by Digital Image Processing for Simultaneous Determination of Catecholamines and Related Drugs. *Talanta* **2013**, 114 (Supplement C), 117–123.
- (105) Vogel, Arthur Israel, 1905- Bassett, John, 1924-. *Análise Inorgânica Quantitativa : Incluindo Análise Instrumental Elementar*, 4th ed.; Guanabara Dois, Ed.; Rio de Janeiro, 1981.
- (106) Mecatrônica, T. tekno mecatrônica <https://www.tekkno.com.br/> (accessed Mar 21, 2019).
- (107) Reich, E.; Blatter, A. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY | Method Development; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. B. T.-E. of A. S. (Second E., Eds.; Elsevier: Oxford, 2005; pp 83–91.
- (108) Impressão 3D <http://www.impressao3dfacil.com.br/conheca-os-diferentes-tipos-de-materiais-para-impressao-3d-fdm/> (accessed Nov 15, 2017).