

QUÍMICA ANALÍTICA

JOSÉ CARLOS MARQUES

<http://www.uma.pt/jcmarques>

- *Introdução*
 - Histórico / aspectos gerais
 - Análise qualitativa / análise quantitativa
 - Análise clássica / análise instrumental
- *Análise espectrofotométrica*
 - Introdução à espectroscopia
 - Análise por infra-vermelhos
 - Análise por UV-vis
 - Absorção atómica
- *Técnicas de separação cromatográficas*
 - Teoria / critérios de classificação / modelos de equilíbrio / glossário
 - Cromatografia em camada fina
 - Cromatografia Gás-líquido
 - Cromatografia Líquido-líquido
- *Técnicas hífenadas*
 - Introdução a EM / NMR
 - GCFTIR / GCMS / LCMS
- *Tratamento de amostras / Tratamento de dados / Segurança*

* Objectivos

- *Dar aos alunos um conhecimento geral da química analítica, com destaque para a análise instrumental*
- *Abordar os métodos de análise espectrométrica e métodos cromatográficos bem como dos equipamentos e terminologia a usar.*
- *Desenvolver nos alunos a noção das potencialidades destas técnicas na separação, identificação e na determinação de componentes de misturas complexas.*
- *Familiarizar os alunos com os métodos correntes de aquisição e tratamento de dados analíticos*

Carga horária

- Teóricas: 48 horas
 - Início a 21/09
- Práticas: 24 horas
 - Início a 11/10
- Atendimento ao aluno

□ Avaliação

- *Presença nas aulas: 10%*
- *Trabalhos grupo: 10%*
- *1 teste: 25%, marcado para: 18.11.10*
- *2 teste: 25%, marcado para: 13.01.11*
- *Informação prática: 20% (+ 10% da apresentação, prevista para 20.01.11)*
 - *Presença de 75% das aulas, excepto se justificado*
 - *Haverá retenção em caso de incumprimento*

- ✓ **Exame de recurso: avaliação inferior a 50% (ou falta de 1 teste ou 2 elementos de avaliação (apenas um teste)**
- ✓ **A falta de mais de 2 elementos de avaliação (ou 2 testes) implica retenção**
- ✓ **O exame de recurso permite uma valorização de 40% da avaliação global e envolve toda a matéria**

Avaliação

17:11

www.uma.pt/icmarques

Frequências	Teórica/ Teórico-prática	pretende realizar, sendo o máximo 3	pretendida para cada frequência	das aulas ou caso necessite de mais salas, indique <u>quantas salas</u> irá necessitar e em que <u>horário</u> .	cada frequência na avaliação final	de cada elemento, de acordo com o ponto 9 do artigo 4º	recuperados em recurso, e quais não podem
		2	_18_/11/_10		25%	50%	
		13/_01/_11		25%	50%		
		//_					
Trabalhos ou relatórios e/ou Provas orais	Prática	Indique o tipo de elementos que pretende realizar, sendo o total de elementos (independentemente do tipo) no máximo 6	Indique as datas pretendidas para cada elemento	Caso o elemento de avaliação seja realizado fora do horário normal das aulas ou caso necessite de mais salas, indique <u>quantas salas</u> irá necessitar e em que <u>horário</u> .	Indique o peso de cada elemento na avaliação final	Indique a nota mínima desta componente, ou de cada elemento, de acordo com o ponto 9 do artigo 4º	Indique quais os elementos que podem ser recuperados em recurso, e quais não podem
		presenças e participações	_/_/_		10%		
		trabalhos de grupo	_/_/_		10%		
		avaliação prática e apresentação	20/_01/_11		30%		
			//_				
	//_						

- ▣ *Analytical Chemistry; Skoog, West, Heller; Saunders*
- ▣ *Principles of Instrumental Analysis; D.A. Skoog; Saunders*
- ▣ *Thin Layer Chromatography; Hamilton, Hamilton; ACOL*

- ▣ *Instrumental Methods of Chemical Analysis; Galen W. Ewing; McGraw-Hill*
- ▣ *Análise Instrumental; H. Willard, L. Merrit Jr., J. Dean; Fundação Calouste Gulbenkian*
- ▣ *Introdução à Prática da Cromatografia Gás-Líquido; H.J.Chaves das Neves; Universidade Nova de Lisboa*
- ▣ *Practice of Thin Layer Chromatography; Joseph C. Touchstone; Wiley*
- ▣ *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial; A.J.L.O. Pombeiro; Fundação Calouste Gulbenkian*
- ▣ *Documentação disponibilizada pelo docente*

- Analytical Chemistry; Skoog, West, Heller; Saunders
 - Capítulos: 1, 2, 3, 4, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32
- Thin Layer Chromatography; Hamilton, Hamilton; ACOL
 - Capítulos 1, 2, 3, 4, 5
 - **Qualquer matéria incluída nestes capítulos pode ser utilizada em exame (ou testes), independentemente da profundidade em que é tratada nas aulas**
 - *Aconselha-se a leitura dos capítulos adequados da restante bibliografia*
- Os alunos sem foto no InfoAlunos, devem enviar um foto digitalizada para jcmensino@gmail.com
- Os transparentes serão colocados na net (www.uma.pt/jcmarques/qa.htm)
- Os grupos terão um trabalho a desenvolver durante o semestre
 - *Video (até 5 minutos) sobre uma técnica analítica*
 - *As aulas práticas terão início mais tarde (a definir) ----- 11.10.2010*
 - *Fica definida uma hora (e meia) de apoio aos alunos: Terça Feira das 10:30 às 12:00*
 - Podem vir falar comigo em qualquer hora, sempre que necessário

- Objectivo
 - ▣ *Conhecer as vossas necessidades e expectativas*
 - ▣ *Não necessita de ser assinado*
 - ▣ *Todas as sugestões construtivas serão bem vindas*

- Resultados
 - ▣ *Os resultados serão divulgados posteriormente*

- Fins do século XIX - Ostwald (1895)
 - ▣ *Química analítica ... Arte de reconhecer substâncias diferentes e de determinar os seus constituintes.*
- Fins do século XX
 - ▣ *ramo da Ciência associado ao desenvolvimento e melhoramento contínuo dos métodos de caracterização de produtos. A interpretação de resultados envolve várias áreas da Ciência.*
- Análise qualitativa
 - ▣ *identificação de compostos maioritários*
 - ▣ *Análise clássica*
 - ▣ *IV - NMR ... métodos de pouca sensibilidade*
- Análise quantitativa
 - ▣ *doseamentos*
 - ▣ *determinação de traços (ordem do **fg**)*
 - ▣ *Geralmente baseada na utilização de equipamentos sofisticados*

Especificação de Hiclato de doxiciclina (farm.port.)

17:11

www.uma.pt/jcmarques

Hiclato de doxiciclina

Perda por secagem (2.2.32). Determinada a 60°C, sob uma pressão que não ultrapasse 670 Pa, durante 2 h, em 0,500 g da amostra, não deve ser superior a 5,0 por cento.

Endotoxinas bacterianas (2.6.14). A concentração máxima admissível é de 2,0 U.I. de endotoxinas por Unidade Internacional de actividade de hialuronidase.

Esterilidade (2.6.1). A hialuronidase destinada à preparação de formas farmacêuticas destinadas à administração por via parentérica, sem outro processo adequado de esterilização, deve satisfazer ainda ao ensaio de esterilidade.

AFERIÇÃO

A actividade da hialuronidase é avaliada por comparação da velocidade de hidrólise de hialuronato de sódio PBR com a obtida com o padrão internacional ou uma preparação de referência calibrada em Unidades Internacionais, utilizando um método de registo de inclinação.

Solução de referência. Num matraz de 25 ml introduza 0,10 g de hialuronato de sódio PBR e junte lentamente 20,0 ml de água R a 4°C. O debrão na adição da água R deve ser bastante fino para permitir a intumescência das partículas do substrato (coroa de 5 min). Mantenha a agitação da mistura a 4°C durante, pelo menos, 12 h. Conservada a 4°C, a solução é estável durante 4 dias.

Solução problema. Dissolva uma quantidade apropriada da amostra na solução de diluição de hialuronidase R de modo que se obtenha uma solução contendo 0,6 e 0,3 U.I. de actividade de hialuronidase por mililitro.

Solução padrão. Dissolva uma quantidade apropriada de hialuronidase PBR na solução de diluição de hialuronidase de modo a obter uma solução contendo 0,6 U.I. de actividade de hialuronidase por mililitro.

Num tubo de ensaio misture 1,50 ml de solução tampão de fosfato de pH 6,4 R e 1,0 ml de solução de substrato e equilibre a 37 ± 0,1°C. No tempo t=0 (primeiro cronómetro), junte 0,50 ml da solução problema contendo uma quantidade F mg da enzima em ensaio. Misture e determine a viscosidade da solução por meio de um viscosímetro apropriado, mantido a 37 ± 0,1°C. Registe o tempo de escoamento (t) utilizando um segundo cronómetro (graduado em décimos de segundo), várias vezes durante cerca de 20 min (leitura feita no primeiro cronómetro).

Repita o processo usando 0,50 ml da solução padrão contendo uma quantidade F₀ (mg) de hialuronidase PBR.

Calcule a relação de viscosidade usando a fórmula:

$$k = \frac{F \times t_0}{F_0 \times t}$$

k = constante viscosimétrica em ml²/s² (indicada no viscosímetro);

t₀ = tempo de escoamento (em segundos) da solução;

0,6915 = viscosidade cinemática em ml²/s da solução tampão a 37°C.

Desde que a reacção enzimática prosiga durante as determinações do tempo de escoamento, o tempo real de reacção é igual a t + t₀, metade do tempo de escoamento (t/2) durante o qual uma certa determinação é válida tendo adicionado o tempo t₀.

momento em que a determinação começou. Represente graficamente (t+k)² em função do tempo de reacção (t + t₀/2) em segundos. Deve obter-se uma relação linear. Calcule a inclinação para a amostra (k) e para a solução padrão (b).

Calcule a actividade específica em Unidades Internacionais por miligramma usando a fórmula:

$$A = \frac{k \times 100}{b \times X} \times A_0$$

A = actividade específica de hialuronidase PBR em Unidades Internacionais por miligramma;

Efectue a totalidade do ensaio pelo menos 3 vezes e calcule a actividade média da amostra.

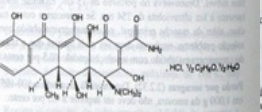
CONSERVAÇÃO. O hiclato de doxiciclina deve ser conservado em recipiente estanque, a temperatura compreendida entre 2 e 8°C. Se a substância for estéril, deve ser conservada em recipiente estéril, estanque e de fecho inviolável.

ROTULAGEM. No rótulo deve indicar-se:

- a actividade em Unidades Internacionais por miligramma, nos casos apropriados, que a substância é estéril;
- a actividade em Unidades Internacionais por miligramma, nos casos apropriados, que a substância é estéril.

HICLATO DE DOXICICLINA

Doxycycline hyclate



DEFINIÇÃO

O hiclato de doxiciclina é o hemietarato do hemicloridrato de (5S,6R,5S,6R,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetra-hidro-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-2-carboximidazolo[5,4-b]piridina-2-carboxilato de hidrato. É equivalente a 94,0 por cento de doxiciclina (C₂₂H₂₆N₂O₈), calculada em relação à substância anidra e isenta de etanol.

Hiclato de doxiciclina

ção à substância anidra e isenta de etanol, a absorvência específica deve estar compreendida entre 300 e 335. Efectue a determinação na hora seguinte à preparação da solução.

Impurezas absorventes da luz. Dissolva 0,10 g da amostra numa mistura de 1 volume de ácido clorídrico 1 M e 99 volumes de metanol R e complete 10,0 ml com a mesma mistura de solventes. Determinada em 490 nm (2.2.25), e calculada em relação à substância anidra e isenta de etanol, a absorvência não deve ser superior a 0,07. Efectue a determinação na hora seguinte à preparação da solução.

Substâncias aparentadas. Proceda por cromatografia líquida (2.2.29), conforme as indicações dadas em "Documento". Injete a solução problema e a solução padrão (a). Se aparecer, no cromatograma obtido com a solução problema, um pico correspondente à metaciclina ou um pico correspondente à 6-epidoxiciclina, a sua área não deve ser superior à área dos picos correspondentes do cromatograma obtido com a solução padrão (a) (2,0 por cento). Se aparecerem, no cromatograma obtido com a solução problema, picos situados entre o pico devido ao solvente e o pico devido à metaciclina ou picos situados na cauda do pico principal, a área de nenhum deles deve ser superior a 25 por cento da do pico correspondente à 6-epidoxiciclina do cromatograma obtido com a solução padrão (a) (0,5 por cento).

Etanol. Proceda por cromatografia em fase gasosa (2.2.28), utilizando o propanol R como padrão interno.

Solução do padrão interno. Dilua 0,50 ml de propanol R com água R e complete 1 000,0 ml com o mesmo solvente.

Solução problema (a). Dissolva 0,10 g da amostra em água R e complete 10,0 ml com o mesmo solvente.

Solução problema (b). Dissolva 0,10 g da amostra na solução do padrão interno e complete 10,0 ml com a solução do padrão interno.

Solução padrão. Dilua 0,30 ml de etanol R com solução do padrão interno e complete 100,0 ml com a mesma solução. Tome 1,0 ml da solução obtida e complete 10,0 ml com a solução do padrão interno.

A cromatografia pode ser realizada utilizando:

- uma coluna com 1,5 m de comprimento e 4 mm de diâmetro interno cheia com polímero etilvinilbenzeno-divinilbenzeno R (150-180 µm);
- anteo para cromatografia R, como gás vector;
- um detector de ionização de chama.

Mantenha a temperatura da coluna a 135°C e a da câmara de injeção e a do detector a 150°C. Injete o volume escolhido de cada uma das soluções problema e da solução padrão.

Calcule o teor em etanol na amostra, tomando 0,790 g por mililitro como massa volumétrica (2.2.5) do etanol a 20°C.

O hiclato de doxiciclina deve conter de 4,3 por cento a 5,6 por cento em peso de etanol.

Metais pesados (2.4.8). 0,5 g da amostra devem satisfazer ao ensaio limite C dos metais pesados (50 ppm). Prepare o padrão com 2,5 ml de solução a 10 ppm de chumbo (Pb) R.

Água (2.5.12). Determinado pelo semi-micrométodo em 1,20 g da amostra, o teor em água deve estar compreendido entre 1,4 e 2,8 por cento.

minado em 1,00 g da amostra, o teor em água deve ser superior a 0,4 por cento.

doxiciclina destinado à preparação de formas farmacêuticas para administração por via parentérica de esterilização, deve esterilidade.

Se o hiclato de doxiciclina se hialuronidase para administração por via parentérica de esterilização, a concentração admissível de por miligramma.

CONSERVAÇÃO

Em recipiente estanque, ao abrigo da luz. Se a substância for estéril, deve ser conservada em recipiente estanque, estéril e de fecho inviolável.

ROTULAGEM

No rótulo deve indicar-se:

- nos casos apropriados, que a substância é estéril;
- nos casos apropriados, que a substância está isenta de endotoxinas bacterianas.

IMPUREZAS

1 ml da solução padrão (a), 1 ml da solução padrão (c) e 100,0 ml.

4 da solução padrão (b) com o mesmo solvente.

utilizando:

- um tubo de 1,0 ml por minuto, uma ir se indica: transfira 60,0 ml a R; junte 400 ml de solução tampão de hidrogenocarbonato, ajustada para pH 8,0 com sódio R, e 10 ml de solução I, ajustada para pH 8,0 com sódio R; complete 1 000 ml com água R.

para 254 nm, como detector, 20 µl.

o a sensibilidade de modo a pelo menos, metade da escala

zo (metaciclina) e o segundo inferior a 1,25.

4-epidoxiciclina.

- a resolução entre o segundo pico e o terceiro pico (doxiciclina) não for inferior a 2,0; se necessário, ajuste o teor da fase móvel em 2-metil-2-propanol.

- o factor de simetria do terceiro pico não for superior a 1,25.

Injete seis vezes a solução padrão (a). O ensaio só será válido se o desvio padrão relativo da área do pico da doxiciclina não for superior a 1,0 por cento. Se necessário, proceda ao ajustamento do integrador. Injete alternadamente a solução problema e a solução padrão (a).

Calcule o teor por cento de doxiciclina.

Se o hiclato de doxiciclina for utilizado para administração por via parentérica de esterilização, a concentração admissível de por miligramma.

CONSERVAÇÃO

Em recipiente estanque, ao abrigo da luz. Se a substância for estéril, deve ser conservada em recipiente estanque, estéril e de fecho inviolável.

ROTULAGEM

No rótulo deve indicar-se:

- nos casos apropriados, que a substância é estéril;
- nos casos apropriados, que a substância está isenta de endotoxinas bacterianas.

IMPUREZAS

1 ml da solução padrão (a), 1 ml da solução padrão (c) e 100,0 ml.

4 da solução padrão (b) com o mesmo solvente.

utilizando:

- um tubo de 1,0 ml por minuto, uma ir se indica: transfira 60,0 ml a R; junte 400 ml de solução tampão de hidrogenocarbonato, ajustada para pH 8,0 com sódio R, e 10 ml de solução I, ajustada para pH 8,0 com sódio R; complete 1 000 ml com água R.

para 254 nm, como detector, 20 µl.

o a sensibilidade de modo a pelo menos, metade da escala

zo (metaciclina) e o segundo inferior a 1,25.

CONSERVAÇÃO

Em recipiente estanque.

HICLATO DE DOXICICLINA

Piperazinum hydricum



5 junte 2 ml de solução de sulfato de sódio R. Deve formar-se uma suspensão amarela, passando em seguida a acinzentada, podendo formar-se, de reposo, um precipitado vermelho.

g da amostra em água isenta de dióxido de carbono, deve ser superior a 2,5 mg com o mesmo solvente.

DEFINIÇÃO

O hiclato de piperazina contém, no mínimo, 98,0 por cento e, no máximo, o equivalente a 101,0 por cento de piperazina hexahidratada.

Hidrato de piperazina

Aspecto da solução. A solução S deve ser límpida (2.2.1) e incolor (Método II, 2.2.2).

pH (2.2.3). O pH da solução S deve estar compreendido entre 3,5 e 5,5.

Alcoólato de cloral. Adicione 1,0 g da amostra com 10 ml de solução tampão de hidróxido de sódio R. Filtre o líquido sobrenadante e junte, gota a gota, todo 0,05 M de coloração amarela persistente. Após reposo de 1 h não deve ocorrer a formação de precipitado.

Cloratos (2.4.4). Tome 5 ml da solução S e complete 15 ml com água R. A solução deve satisfazer ao ensaio limite dos cloratos (100 ppm).

Metais pesados (2.4.8). Tome 7,5 ml da solução S e complete 15 ml com água R. A solução deve satisfazer ao ensaio limite A dos metais pesados (20 ppm). Prepare o padrão com solução a 1 ppm de chumbo (Pb) R.

Resíduos não voláteis. Evapore em banho de água 2,00 g da amostra. A massa do resíduo não deve ser superior a 2 mg (0,1 por cento).

DOSEAMENTO

Dissolva 4,000 g da amostra em 10 ml de água R, junte 40,0 ml de hidróxido de sódio 1 M e deixe em repouso durante exactamente 2 min. Títule com ácido sulfúrico 0,5 M, em presença de 0,1 ml de solução de fenolftaleína R. Títule a solução neutralizada com nitrato de prata 0,1 M em presença de 0,2 ml de solução de cromato de potássio R. Calcule o número de mililitros de hidróxido de sódio 1 M gastos, subtraindo de 40,0 ml a soma do volume de ácido sulfúrico 0,5 M e de 2/15 do volume de nitrato de prata 0,1 M.

1 ml de hidróxido de sódio 1 M corresponde a 0,1654 g de C₈H₁₂N₂O₂.

CONSERVAÇÃO

Em recipiente estanque.

parentes, muito solúveis na água, fácil e no teor.

HICLATO DE DOXICICLINA

Piperazinum hydricum



5 junte 2 ml de solução de sulfato de sódio R. Deve formar-se uma suspensão amarela, passando em seguida a acinzentada, podendo formar-se, de reposo, um precipitado vermelho.

g da amostra em água isenta de dióxido de carbono, deve ser superior a 2,5 mg com o mesmo solvente.

DEFINIÇÃO

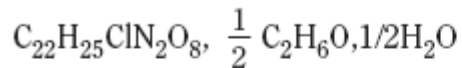
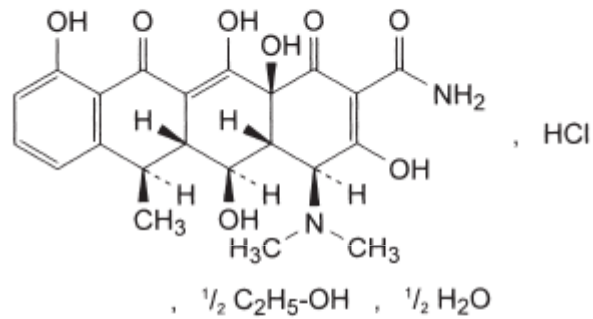
O hiclato de piperazina contém, no mínimo, 98,0 por cento e, no máximo, o equivalente a 101,0 por cento de piperazina hexahidratada.

Especificação de Hiclato de doxiciclina

17:11

HICLATO DE DOXICICLINA

Doxycyclini hyclas



M_r 512,9

DEFINIÇÃO

Hemietanol hemi-hidratado do cloridrato de (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aS*)-4-dimetilamino-3,5, 10,12,12*a*-penta-hidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6, 11,1 2*a*-octa-hidronaftaceno-2-carboxamida, substância antimicrobiana obtida a partir da oxitetraciclina ou da metaciclina ou por qualquer outro meio.

Teor: 95,0 por cento a 102,0 por cento de $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_8$ (substância seca e isenta de etanol).

Note que a molécula de doxiciclina está associada a:

- 1/2 molécula de água
- 1/2 molécula de etanol
- 1 molécula de HCl

CARACTERÍSTICAS

Aspecto: pó cristalino, amarelo, higroscópico.

Solubilidade: facilmente solúvel na água e no metanol, ligeiramente solúvel no álcool. Dissolve-se nas soluções dos hidróxidos e dos carbonatos dos metais alcalinos.

Cristalino ? Importante?

Amarelo ? Porquê?

solubilidade ? como medir?

Solubilidade. As indicações de solubilidade que figuram na rubrica “Características” são expressas em termos que têm o significado seguinte, para uma temperatura compreendida entre 15 e 25°C:

Termos descritivos	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	de 1 a 10
Solúvel	de 10 a 30
Ligeiramente solúvel	de 30 a 100
Pouco solúvel	de 100 a 1000
Muito pouco solúvel	de 1000 a 10000
Praticamente insolúvel	mais de 10000

O termo “parcialmente solúvel” é utilizado no caso de uma mistura em que certos constituintes se dissolvem. O termo “miscível” é utilizado no caso de um líquido miscível em todas as proporções com o solvente indicado.

IDENTIFICAÇÃO

A. Examine os cromatogramas obtidos no doseamento.

Resultado: o pico principal do cromatograma obtido com a solução problema é semelhante, quanto ao tempo de retenção e dimensões, ao pico principal do cromatograma obtido com a solução padrão (a).

B. A cerca de 2 mg da amostra junte 5 ml de ácido sulfúrico R. Desenvolve-se coloração amarela.

C. A amostra dá a reacção (a) dos cloretos (2.3.1).

Cromatogramas ?
Doseamento?

pH?
Polarimetria?

ENSAIO

pH (2.2.3): 2,0 a 3,0.

Dissolva 0,1 g da amostra em água isenta de dióxido de carbono R e complete 10 ml com o mesmo solvente.

Poder rotatório específico (2.2.27): -105 a -120 (substância seca e isenta de etanol).

Dissolva 0,250 g da amostra numa mistura de 1 volume de ácido clorídrico 1 M e 99 volumes de metanol R e complete 25,0 ml com a mesma mistura de solventes. Efectue as determinações nos 5 minutos seguintes à preparação da solução.

Absorvência específica (2.2.25): 300 a 335, determinada no máximo em 349 nm (substância seca e isenta de etanol).

Dissolva 25,0 mg da amostra numa mistura de 1 volume de ácido clorídrico 1 M e 99 volumes de metanol R e complete 25,0 ml com a mesma mistura de solventes. Tome 1,0 ml desta solução e complete 100,0 ml com uma mistura de 1 volume de ácido clorídrico 1 M e 99 volumes de metanol R. Efectue a determinação na hora seguinte à preparação da solução.

Impurezas absorventes da luz. A absorvência (2.2.25) determinada em 490 nm, é, no máximo, de 0,07 (substância seca e isenta de etanol).

Dissolva 0,10 g da amostra numa mistura de 1 volume de ácido clorídrico 1 M e 99 volumes de metanol R e complete 10,0 ml com a mesma mistura de solventes. Efectue a determinação na hora seguinte à preparação da solução.

349 nm?

490 nm?

UV-vis?

Substância seca e isenta de etanol?

Substâncias aparentadas. Cromatografia líquida (2.2.29).

Prepare as soluções imediatamente antes do emprego.

Solução problema. Dissolva 20,0 mg da amostra em ácido clorídrico 0,01 M e complete 25,0 ml com o mesmo ácido.

Solução padrão (a). Dissolva 20,0 mg de hclato de doxiciclina SQR em ácido clorídrico 0,01 M e complete 25,0 ml com o mesmo ácido.

Solução padrão (b). Dissolva 20,0 mg de cloridrato de 6-epidoxiciclina SQR em ácido clorídrico 0,01 M e complete 25,0 ml com o mesmo ácido.

Solução padrão (c). Dissolva 20,0 mg de cloridrato de metaciclina SQR em ácido clorídrico 0,01 M e complete 25,0 ml com o mesmo ácido.

Solução padrão (d). Misture 4,0 ml da solução padrão (a), 1,5 ml da solução padrão (b) e 1,0 ml da solução padrão (c) e complete 25,0 ml com ácido clorídrico 0,01 M.

Solução padrão (e). Misture 2,0 ml da solução padrão (b) e 2,0 ml da solução padrão (c) e complete 100,0 ml com ácido clorídrico 0,01 M.

Coluna:

- *dimensões:* $l = 0,25$ m; $\varnothing = 4,6$ mm,
- *fase estacionária:* copolímero estireno-divinilbenzeno R (8 μm),
- *temperatura:* 60°C.

254 nm?
Cromatografia líquida?

Fase móvel: pese 60,0 g de 2-metil-2-propanol R e passe para um balão marcado de 1000 ml usando 200 ml de água R; junte 400 ml de solução tampão de pH 8,0 R, 50 ml de uma solução de hidrogenossulfato de tetrabutilamônio R a 10 g/l ajustada para pH 8,0 com solução diluída de hidróxido de sódio R e 10 ml de solução de edetato de sódio R a 40 g/l ajustada para pH 8,0 com solução diluída de hidróxido de sódio R; complete 1000,0 ml com água R.

Débito: 1,0 ml/min.

Deteção: espectrofotómetro em 254 nm.

Injeção: 20 μl ; injecte a solução problema e as soluções padrão (d) e (e).

Retenção relativa em relação à doxiciclina: impureza E = cerca de 0,2; impureza D = cerca de 0,3; impureza C = cerca de 0,5; impureza F = cerca de 1,2.

Conformidade do sistema: solução padrão (d):

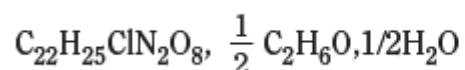
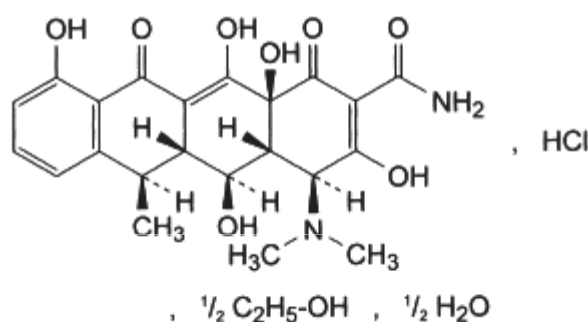
- *resolução:* no mínimo, 1,25 entre os picos devidos à impureza B (1º pico) e à impureza A (2º pico) e, no mínimo, 2,0 entre os picos devidos à impureza A e à doxiciclina (3º pico); se necessário, ajuste o teor de 2-metil-2-propanol da fase móvel,
- *factor de simetria:* no máximo, 1,25 para o terceiro pico.

Limites:

- *impureza A:* no máximo, a área do pico correspondente do cromatograma obtido com a solução padrão (e) (2,0 por cento),
- *impureza B:* no máximo, a área do pico correspondente do cromatograma obtido com a solução padrão (e) (2,0 por cento),
- *qualquer outra impureza:* no máximo, 0,25 vezes a área do pico devido à impureza A do cromatograma obtido com a solução padrão (e) (0,5 por cento),
- *limite de exclusão:* 0,05 vezes a área do pico devido à impureza A do cromatograma obtido com a solução padrão (e) (0,1 por cento).

HICLATO DE DOXICICLINA

Doxycyclini hyclas



M_r 512,9

Etanol? GC? 4,3 a 6%?

Coluna? Enchimento?

Detector de ionização de chama?

Etanol. Cromatografia em fase gasosa (2.2.28)

Solução do padrão interno. Dilua 0,50 ml de propanol R em água R e complete 1000,0 ml com o mesmo solvente.

Solução problema (a). Dissolva 0,10 g da amostra em água R e complete 10,0 ml com o mesmo solvente.

Solução problema (b). Dissolva 0,10 g da amostra na solução do padrão interno e complete 10,0 ml com a mesma solução.

Solução padrão. Dilua 0,50 de etanol R na solução do padrão interno e complete 100,0 ml com solução do padrão interno. Tome 1,0 ml desta solução e complete 10,0 ml com solução padrão interno.

Coluna:

- *dimensões:* l = 1,5 m; Ø = 4,0 mm,
- *fase estacionária:* copolímero etilvinilbenzeno-divinilbenzeno R (150-180 µm).

Gás vector: azoto para cromatografia R.

Temperatura:

- *coluna:* 135°C,
- *câmara de injeção e detector:* 150°C.

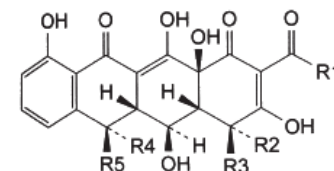
Deteção: ionização de chama.

Calcule o teor em etanol na amostra tomando 0,790 g/ml como valor da massa volúmica (2.2.5) do etanol a 20°C.

Limites:

- *etanol:* 4,3 por cento a 6,0 por cento.

IMPUREZAS



- A. $R1 = NH_2$, $R2 = R5 = H$, $R3 = N(CH_3)_2$, $R4 = CH_3$:
(4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(Dimetilamino)-3,5,10,12,12a-penta-hidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octa-hidrotetraceno-2-carboxamida (6-epidoxiciclina),
- B. $R1 = NH_2$, $R2 = H$, $R3 = N(CH_3)_2$, $R4 + R5 = CH_2$:
(4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-penta-hidroxi-6-metileno-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octa-hidrotetraceno-2-carboxamida (metaciclina),
- C. $R1 = NH_2$, $R2 = N(CH_3)_2$, $R3 = R4 = H$, $R5 = CH_3$:
(4*R*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-penta-hidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octa-hidrotetraceno-2-carboxamida (4-epidoxiciclina),
- D. $R1 = NH_2$, $R2 = N(CH_3)_2$, $R3 = R5 = H$, $R4 = CH_3$:
(4*R*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-penta-hidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octa-hidrotetraceno-2-carboxamida (4-epi-6-epidoxiciclina),
- E. $R1 = CH_3$, $R2 = H$, $R3 = N(CH_3)_2$, $R4 = OH$, $R5 = CH_3$:
oxitetraciclina,
- F. $R1 = CH_3$, $R2 = R4 = H$, $R3 = N(CH_3)_2$, $R5 = CH_3$:
(4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aS*)-2-acetil-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-penta-hidroxi-6-metil-4a,5,5a,6,12a-tetra-hidrotetraceno-1,11 (4*H*,5*H*)-diona (2-acetil-2-decarbamoidoxiciclina).

Metais pesados (2.4.8). no máximo, 50 ppm.

0,5 g da amostra satisfazem ao ensaio limite C. Prepare o padrão com 2,5 ml de solução a 10 ppm de chumbo (Pb) R.

Água (2.5.12): 1,4 por cento a 2,8 por cento, determinada em 1,20 g da amostra.

Cinzas sulfúricas (2.4.14): 0,4 por cento, determinadas em 1,00 g da amostra.

Endotoxinas bacterianas (2.6.14). Se o hidrato de doxiciclina se destinar à preparação de formas farmacêuticas para administração por via parentérica, sem outro processo apropriado de eliminação de endotoxinas bacterianas, a concentração admitida de endotoxinas é de 1,14 U.I. por miligrama.

Metais pesados?
Karl-Fischer?
Cinzas? 650 C?

Endotoxinas?

DOSEAMENTO

Cromatografia líquida (2.2.29) segundo as prescrições do ensaio das substâncias aparentadas com a seguinte modificação:

Injecção: solução problema e solução padrão (a).

Calcule o teor por cento em $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$ ($M_r = 480,9$).

CONSERVAÇÃO

Em recipiente estanque, ao abrigo da luz. Se a substância for estéril, é conservada em recipiente estanque, estéril e de fecho inviolável.

ROTULAGEM

No rótulo indica-se:

- nos casos apropriados, que a substância é estéril,
- nos casos apropriados, que a substância está isenta de endotoxinas bacterianas.

- **Análise clássica (wet chemistry)**
 - identificações em geral / presença de impurezas
 - *Envolve reacções químicas, dissolução, extracção e estequiometria;*
 - *Podem apresentar elevada exactidão, se correctamente realizada*
 - *Usual em pequenos laboratórios*
 - *Podem ser muito elaboradas e demoradas*
 - *Equipamentos usados: aparelho de pH e balança analítica.*

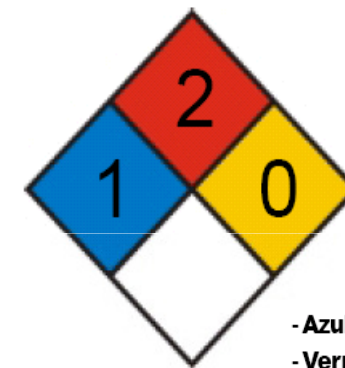
- **Análise instrumental**
 - elevada precisão e exactidão nos resultados / sensibilidade aos avanços da electrónica e informática
 - *Usa essencialmente equipamento sofisticado, podendo envolver reacções químicas*
 - *É geralmente mais rápida (pode não ser mais sensível nem mais precisa)*
 - *Muito usada na identificação e quantificação de traços*

Importância da análise química

17:11

- Controlo da qualidade
 - ▣ *Manufactura (medicamentos)*
- Determinação de produtos perigosos
 - ▣ *segurança*
- Diagnóstico de doenças
 - ▣ *saúde*
- Determinação do valor económico dos bens
 - ▣ *Valor relativo (por comparação)*
- Determinação das propriedades
 - ▣ *Aplicações*
- Investigação
 - ▣ *Mais de 100 000 moléculas registadas (de uso comercial)*
 - Registo Eines- Registo Europeu das substâncias químicas
 - 10 000 novas moléculas por ano

Rótulo de risco de acordo com o standard da NFPA



"Diamante de Hommel"

- Azul - saúde
- Vermelho - inflamabilidade
- Amarelo - reatividade
- Branco

- A Química analítica tem uma natureza interdisciplinar, envolvendo noções de Química-Física, física, electrónica, informática, biologia, fisiologia, toxicologia, química dos materiais, estatística ...
 - *A divisão tradicional em química analítica clássica (gravimetria e volumetria) e química analítica instrumental é considerada obsoleta. Mesmo a divisão entre análise qualitativa e quantitativa perdeu muito do seu significado.*
 - *Cada vez mais a análise química se define como o processo de identificação e quantificação de diversas espécies químicas, formas ou fases em que um elemento pode ocorrer num material*
- Cobre a maior parte de todas as áreas da actividade humana
 - *Controlo ambiental (água, ar, solo)*
 - *Análises clínicas (sangue, urina, ...)*
 - *Qualidade alimentar*
 - *Farmacologia*
 - *Controlo de qualidade industrial*
 - *Área legal (limites, normalização)*
 - *Área forense*
 - *Desenvolvimento dos materiais*
 - ...



- A partir dos anos 30 (*desenvolvimento da electrónica*)
 - *uso de outras características tal como:*
 - *condutividade, absorção / emissão de luz, m/z, fluorescência ...*
 - *aplicação em análises quantitativas de produtos orgânicos, inorgânicos e bioquímicos*
 - *aparecimento de técnicas de separação de elevada eficiência*
 - *a cromatografia rapidamente suplantou a destilação / extracção / precipitação*
 - *emprega teorias e fenómenos conhecidos há muito mas que apenas a electrónica e a informática tornaram acessíveis.*
- **Métodos instrumentais**

emissão de radiação	espectroscopia de emissão (Rx, UV, Vis) / fluorescência fosforescência	carga eléctrica	coulometria
absorção de radiação	espectrofotometria (Rx, UV, Vis, IR, NMR, ESR	corrente eléctrica	polarografia
dispersão	turbidimetria, Raman	resistência eléctrica	condutometria
refracção	refractometria	razão m/z	espectrometria de massa
rotação	polarimetria / dicroísmo circular	velocidade de reacção	cinética
potencial eléctrico	potenciometria	propriedades térmicas	condutividade térmica
		radioactividade	activação

- Massa ou volume
 - ▣ *Gravimetria (massa)*
 - ▣ *Volumetria (volume)*
- Outras características
 - ▣ *electroanalítica - medição de propriedades eléctricas*
 - potencial / corrente / resistência / quantidade de electricidade
 - ▣ *espectroscopia - medição da interacção com a radiação electromagnética*
 - Rx / UV / Vis / IV / RMN
 - ▣ *miscelânea*
 - m/z / condutividade / calor de reacção / velocidade de reacção / índice de refração / conductividade térmica ...
- Para DOSEAR um produto são necessários métodos rigorosos
 - ▣ *doseamento - determinação da quantidade de dado composto / elemento na amostra em estudo*

- Passos de uma análise quantitativa

Seleccionar o método

Obter amostra representativa

Preparar a amostra

Definir réplicas

Dissolver as amostras

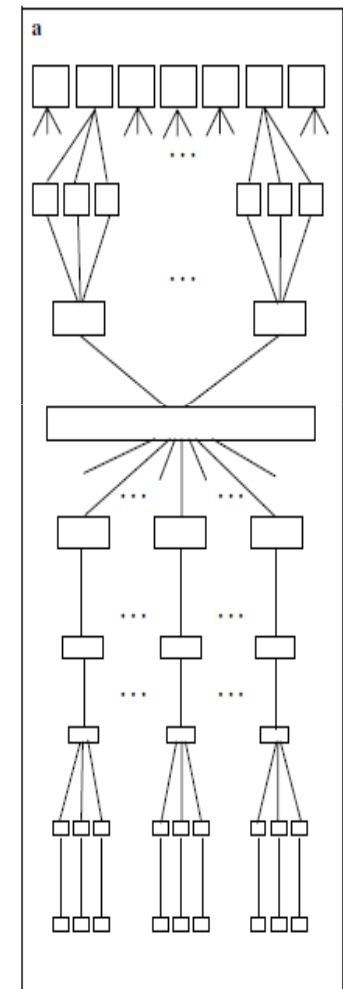
Eliminar interferências

Efectuar a medição

Calcular os resultados

Estimar a confiança no resultado

- **Seleccionar o método**
 - *Natureza da amostra (e matriz)*
 - Pequena quantidade não permite testar o método
 - A complexidade da matriz influencia a metodologia a seguir
 - Nível de concentração
 - *Tipo de análise (qualitativa ou quantitativa)*
 - *Incerteza (precisão, exactidão)*
 - definição da exactidão necessária / compromisso entre exactidão e custos
 - *Tempo de análise / custos*
- **Obter amostra representativa**
 - *amostragem envolve a obtenção de uma pequena quantidade de amostra “representativa”*
 - *planos de amostragem (Military Standard [E105](#) Practice for Probability Sampling of Ma*
- **Preparar a amostra**
 - *moagem / homogeneização*
 - *armazenagem / higroscopicidade - determinação a seco*
- **Definir réplicas**
 - *réplicas aumentam a qualidade dos resultados - aumenta o grau de confiança*
 - A validação pode diminuir o número de ensaios a realizar



- Dissolver as amostras
 - ▣ *Maioria das análises é feita na fase líquida*
 - ▣ *Problemas de discriminação (solubilidade) e insolubilidade*
 - *ignição / decomposição / fusão / oxidação / redução / derivatização*
- Eliminar interferências
 - ▣ *falta de selectividade / exige por vezes o uso de sofisticadas técnicas de separação (cromatografia / extracção em fase sólida / SPME)*
- Efectuar a medição
 - ▣ *incluir calibração do equipamento*
- Calcular os resultados
 - ▣ *A maioria dos programas de aquisição inclui tratamento de dados*
- Estimar a confiança no resultado
 - ▣ *um resultado analítico sem estimativa do nível de confiança não tem valor*
 - ▣ *os erros podem ser determinados / estimados através da realização de réplicas*
 - ▣ *validação do método*

VALIDATION PRACTICES

13

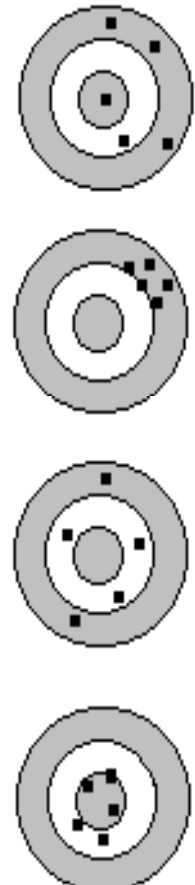
Table 2.1. Guidelines for Drug Potency Assay

Characteristic	Requirement ^a	Characteristic	Requirement ^a
Accuracy	+	Detection limit	–
Precision		Quantitation limit	–
Repeatability	+	Linearity	+
Intermediate precision ^b	+	Range	+
Specificity	+		

^a+, Signifies that this characteristic is normally evaluated; –, signifies that this characteristic is not normally evaluated.

^bIn cases where reproducibility has been achieved, intermediate precision is not needed.

- **Especificidade (selectividade)**
 - poucos métodos são específicos (válidos para uma única substância)
 - falta de especificidade implica a necessidade de separações prévias
- **Linearidade**
 - medida da proporcionalidade em relação à quantidade medida
 - A falta de linearidade representa um desvio entre a quantidade medida e a quantidade real
- **Exactidão (accuracy)**
 - medida do desvio ao valor real
- **Precisão**
 - descreve a influência de erros aleatórios
 - ▣ **repetibilidade**
 - medições feitas nas mesmas condições de operação e num curto intervalo de tempo
 - ▣ **reproductibilidade**
 - medições feitas em condições diferentes: pessoas / local / equipamento / tempo
- **Limite de quantificação (coeficiente de variação < 10%)**
 - Valor mais baixo da linearidade (cerca de 10x o ruído de fundo)
- **Limite de detecção**
 - 3X ruído de fundo!



Validação - definição de termos

17:11

□ Média aritmética

- valor obtido dividindo a soma dos valores obtidos pelo número de réplicas

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

□ Mediana

- valor médio de um conjunto organizado por ordem de tamanhos

□ Precisão

- reprodutibilidade de valores obtidos do mesmo modo (ou não)
- desvio à média:
- desvio padrão:

$$d_i = |x_i - \bar{x}|$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

- coeficiente de variação (% do desvio padrão):

$$CV = (s/\bar{x}).100\%$$

□ Exactidão

- aproximação ao valor real
- Erro absoluto
- Erro relativo

$$E = x_i - x_t$$

$$E_r = \frac{x_i - x_t}{x_t} \times 100\%$$

□ Brancos - determinações em branco

- realização do teste sem amostra / elimina possíveis erros de interferências

Exemplo:

19,4; 19,5; 19,6; 19,7;
19,8; 20,1; 20,3

Média: 19,8
mediana: 19,7

- Num laboratório de cromatografia com dois analistas foram realizados vários testes para verificar se o método em uso para a determinação por GC de etanol em doxiciclina (tipicamente de 4,5%) poderia ser considerado válido. Foram obtidos os seguintes resultados:
 - *tempos de retenção relativos: metanol: 0,3 / acetona : 0,6 / etanol 1,0*
 - *solução amostra (100%) : 12345 / 12450 / 11950 / 12456 / 12100*
 - *soluções α: 20%: 3500 / 40%: 4980 / 60%: 7305 / 80%: 9850 / 100%: 12300 / 120%: 14650*
 - *solução amostra (repetição): 12245 / 12650 / 12405 / 12158 / 12250*
 - *solução amostra (outro dia /analista): 11900 / 13070 / 12347 / 11250 / 12440*
 - *Nota: as percentagens indicadas dizem respeito ao valor típico: 4,5%.*

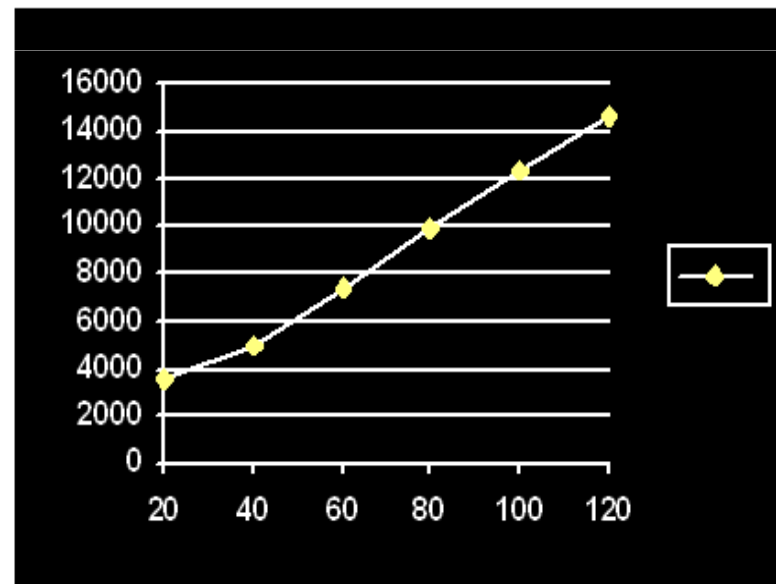
- Qual o valor obtido? Que conclusões poderá tirar quanto à validade do método e à destreza dos analistas envolvidos na determinação? Que sugeria para melhorar a confiança no resultado?

1. Validação de métodos analíticos (cálculos):

Especificidade (selectividade)

O método pode ser considerado selectivo dado que as diferenças entre os solventes em causa são adequadas. Melhor resposta só é possível determinado a resolução (a ver mais tarde no curso).

Linearidade



Equação da recta:

20	40	60	80	100	120
3500	4980	7305	9850	12300	14650
recta: $Y=aX+b$		a=	0,008678		
		b=	-6,05237	RSQ=	0,9949
Após correcção (eliminar 20%):					
		a=	0,008217		
		b=	-0,66613	RSQ=	0,9998

 Exactidão (accuracy)

$y=aX+b$

1º ensaio	12260	% etanol:	4,50 %
2º ensaio	12341		4,53 %
3º ensaio	12201		4,48 %

O método é exacto dado que era esperado um valor com apenas 1 décima (4,5%).

 Precisão**repetibilidade**

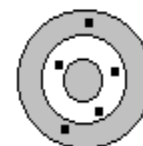
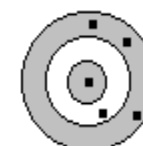
1º ensaio	12260 ± 225 (cv=1,8%)
2º ensaio	12342 ± 194 (cv=1,6%)

É repetitivo (erros inferiores a 2%, bastante aceitável nestes casos)

reproductibilidade

3º ensaio	12201 ± 676 (cv=5,5%)
-----------	-----------------------

Nota-se maior variabilidade introduzida no terceiro ensaio. É provável que este analista precise de formação. Se esse for o caso, não é preciso mais para obter resultados com elevado grau de confiança.



- ❑ A química analítica é uma área interdisciplinar
- ❑ Para uma análise quantitativa deve seguir-se uma metodologia precisa
- ❑ A confiança de um resultado está relacionada com a validação do método
- ❑ A validação pode dar indicações precisas sobre a fragilidade da metodologia, inclusive a falta de experiência (carência de formação)