

DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARES PARA CROMATOGRAFIA

Resumo

Neste artigo são apresentadas algumas inovações no desenvolvimento de softwares para as técnicas cromatográficas: um software para a análise da qualidade e características de colunas cromatográficas envolvendo vários parâmetros (ANACROM); um software o qual pode ser utilizado tanto para o ensino e treinamento em cromatografia, quanto para a diminuição do número de análises quando da otimização de metodologias através de simulações matemáticas à partir de injeções reais de soluções (SIMCROM); um software para o reconhecimento de compostos baseados em um banco de dados relacional contendo índices de retenção, índices de retenção relativa e espectros de massas (CIA); e um software para a validação de metodologias em geral, com textos de auxílio para a obtenção dos valores necessários para o cálculo dos parâmetros relevantes (VALIDATE).

Palavras-chave: software, cromatografia, análise de colunas cromatográficas, validação, simulação

Vitor Hugo Polisé Pacces,
Igor Renato Bertoni Olivares e
Fernando M. Lanças*

Universidade de São Paulo,
Instituto de Química
de São Carlos

* Autor para correspondência:
Cx Postal 780
CEP 13560-970
São Carlos. SP
E-mail: flancas@iqsc.usp.br

Summary

In this article innovations in the development of softwares for chromatographic techniques are presented: a software for the analysis of characteristics and qualities of chromatographic columns (ANACROM); a software which can be used for education and training in chromatography, and for the reduction of the number of analyses during of the optimization of methodologies through mathematical simulations from real injections of solutions (SIMCROM); a software for the compounds identity recognition based on a relationaly data base that contains the retention indices, relative retention indices and mass spectra (CIA); and a software for the validation of methodologies in general with a "wizard" for the attainment of the necessary values for the calculation of the important parameters (VALIDATE).

Keywords: software, chromatography, analyses of chromatographic columns, validation, simulation

Introdução

Há muito tempo, os computadores têm atuado nas mais diferentes áreas, tanto no lazer quanto no trabalho. Cada vez mais os equipamentos dos laboratórios são conectados a estes, facilitando o armazenamento, a organização e gerenciamento dos dados obtidos. Assim, proporcionalmente, aumenta-se a utilização de softwares os quais nos são entregues com os equipamentos e englobam, progressivamente, novos recursos a custos cada vez mais elevados. Mas nem sempre esses recursos são suficientes para atender as nossas necessidades diárias. Para solucionar este problema, o Laboratório de Cromatografia (CROMA) tem investido há 15 anos no desenvolvimento de softwares e, mais atualmente, através de programas escritos na linguagem Visual Basic. Tais programas primam pela facilidade em sua operação, sendo os mesmos

desenvolvidos totalmente em português e voltados para a área cromatográfica.

Análise da Qualidade de Colunas Cromatográficas (1,2)

Num período em que o mercado exige um alto grau de qualidade e a eficiência das análises está intrinsecamente ligada a agilidade e confiabilidade nos resultados, a utilização de colunas cromatográficas degradadas leva a um fraco desempenho, longo período de análises e ajustes demorados na metodologia, além da elevação dos custos e apresentação de resultados pobres e nem sempre condizentes com a realidade.

Com a finalidade de se quantificar a qualidade das colunas cromatográficas, foi desenvolvido um programa (ANACROM) capaz de analisar e comparar a qualidade das mesmas para a cromatografia líquida, gasosa e por fluido supercrítico.

A análise da qualidade da coluna é baseada na capacidade de separação do analito de interesse com relação aos demais compostos. Ou seja, com apenas uma corrida cromatográfica nas condições otimizadas, é possível determinar-se a qualidade de uma coluna. Assim sendo, uma mesma coluna pode ser classificada de diferentes modos, de acordo com o seu grau de deterioração ou capacidade de separação. É possível, ainda, verificar se novas colunas apresentam a qualidade exigida e designada para o fim apropriado.

O que o programa faz, na verdade, é converter os dados obtidos do cromatograma em cálculos, os quais resultam em parâmetros cromatográficos relacionados ao desempenho global de uma análise. Estes parâmetros numéricos são comparados a faixas de qualidade posicionando os mesmos de acordo com estas resultando num valor percentual o qual, quanto maior, melhor.

Para facilitar o entendimento destes parâmetros o programa cria uma barra para cada um destes, com uma classificação de cores onde o vermelho é um resultado sofrível para o parâmetro, amarelo é um resultado regular, verde é um bom resultado e azul é um resultado muito melhor do que o esperado. Este tipo de análise é apresentado na Figura 1.

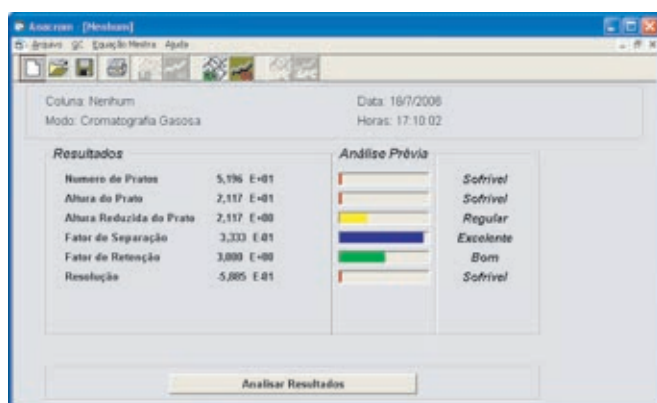


Figura 1. Análise da qualidade dos parâmetros de uma coluna cromatográfica

Para auxiliar ainda mais na compreensão do que significam os resultados obtidos para estes parâmetros, o programa converte os dados numéricos em frases, explicando qual o significado dos mesmos, a implicação destes valores na análise cromatográfica e como melhorar tais valores.

Além disso, o programa permite agilizar a análise sem perder desempenho através de um módulo onde é possível plotar a curva de Knox (cromatografia líquida) ou curva de Van Deemter (cromatografia gasosa), determinando-se os melhores valores de Altura Reduzida Mínima e Velocidade Reduzida Ótima (Figura 2). A curva experimental é comparada com a curva teórica permitindo a visualização gráfica da qualidade da coluna.

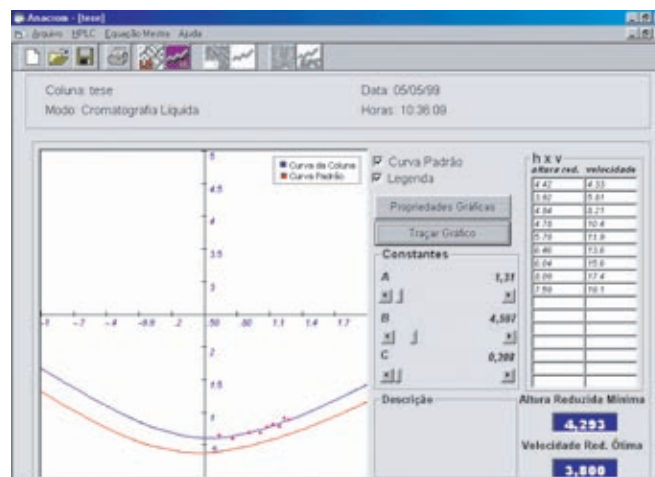


Figura 2. Curva de Knox: gráfico e análise

O usuário poderá ainda, analisar o comportamento de sua coluna cromatográfica através da Equação Mestra da Resolução (Figura 3), na qual é possível avaliar a influência de cada um dos parâmetros que a constituem (fator de separação, fator de retenção e número de pratos).

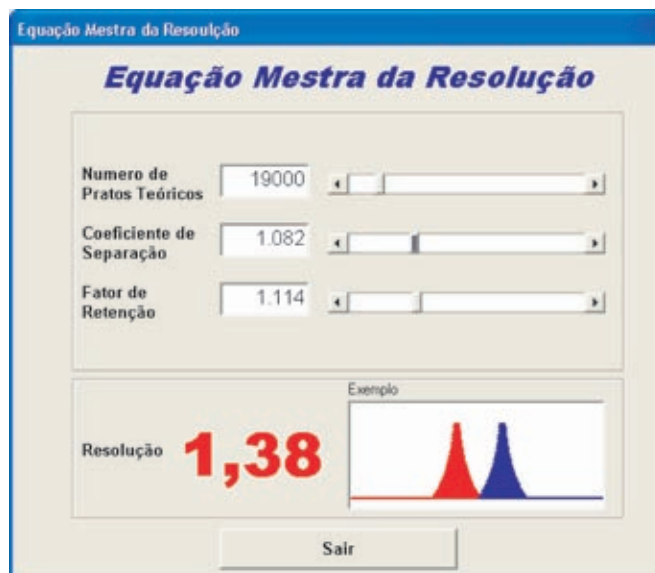


Figura 3. Determinação da Resolução para um par de compostos através da Equação Mestra da Resolução

Simulação Cromatográfica (3-5)

As otimizações em análises cromatográficas demandam tempo, reagentes e padrões analíticos, ocasionando altos custos. Para reduzir o número de análises durante a etapa de otimização foi criado o programa SIMCROM, que requer duas injeções para poder simular os resultados em diferentes condições. Estas injeções devem apresentar condições variadas com relação aos termos de interesse da simulação. Desta forma, pode-se reduzir o número

de análises, uma vez que as condições são alteradas e simuladas no computador antes de serem aplicadas no aparelho.

Outra característica importante do programa é que o mesmo pode ser utilizado didaticamente, demonstrando a influência de cada parâmetro em uma corrida cromatográfica, uma vez que tais simulações são baseadas em informações extraídas de corridas cromatográficas reais.

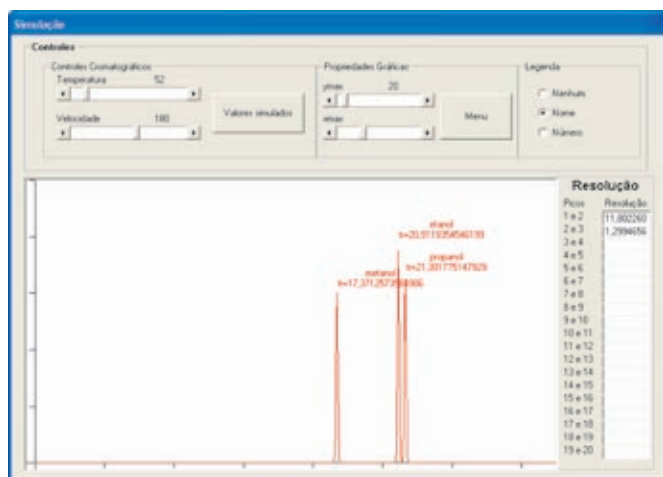


Figura 4. Telas do programa de Simulação Cromatográfica

As simulações são baseadas na alteração dos parâmetros de velocidade do gás de arraste e da temperatura interna do forno. O programa SIMCROM, inicialmente criado para fins didáticos e de treinamento, apresentou excelentes resultados os quais, após refinamento do código do programa e do tratamento matemático, obtiveram-se os valores atuais de desvios (no máximo 2%, quando se mantém a temperatura constante alterando-se a velocidade, e até 10% sob determinadas condições, mantendo-se a velocidade constante alterando-se a temperatura) para qualquer composto em qualquer coluna. Este fator generalizador é citado uma vez que, nos testes realizados utilizando-se compostos polares em colunas polares, compostos apolares em colunas de baixa polaridade, e compostos com polaridade intermediária em colunas polares e apolares, obtiveram-se resultados semelhantes com relação aos desvios apresentados, não variando muito com relação a faixa apresentada e varrendo, assim, todas as possibilidades para colunas e compostos com relação ao comportamento.

Além da simulação, está incluso no mesmo o cálculo automático da resolução de todos os picos consecutivos durante a simulação, o que auxilia no ajuste fino da mesma. Esta parte do programa foi concebida a partir do conhecimento obtido do desenvolvimento do programa Anacrom.

A criação do cromatograma baseada em gaussianas perfeitas não leva em consideração imperfeições dos picos, como as caudas e elevação da linha de base, mas isto não chega a afetar em nada a simulação em si, pois o programa destina-se à otimização da análise e, sendo assim, as gaussianas perfeitas

(objeto de qualquer análise cromatográfica) executam impecavelmente a idéia de como será o cromatograma obtido.

A utilidade do programa Simcrom não se restringe somente a simulação, mas também, a otimização, estudo do comportamento de compostos, separação de compostos específicos, redução no tempo das análises cromatográficas, economia de amostra e principalmente de fase móvel, aumento do tempo de utilização do cromatógrafo, incluindo coluna, injetor e detectores em função da redução do número de injeções por otimização (são necessárias somente duas injeções para se otimizar a análise com relação a temperatura ou a velocidade, e três injeções para a otimização envolvendo os dois parâmetros simultaneamente), utilização para fins didáticos e de treinamento.

Todas estas funções, incluindo total compatibilidade com programas desenvolvidos para ambiente Windows™, e integração com programa Anacrom desenvolvido (por exemplo, traçar a curva de Knox ou Van Deemter baseada nos valores simulados reduzindo, assim, de no mínimo cinco injeções para somente dois) estão presentes no programa Simcrom.

Programa para Reconhecimento de Compostos (6)

Às técnicas cromatográficas aplicam-se não somente para análise quantitativa, mas também para análise qualitativa. Este procedimento é possível graças à utilização do índice de retenção de compostos, em que se assume um comparativo entre a espécie em estudo com uma série homóloga de alcanos. Obtém-se, assim, um valor que expressa a relação do tempo de retenção deste composto e a respectiva série homóloga.

No entanto, muitos compostos apresentam o mesmo índice de retenção, não servindo este resultado como decisivo na identificação de compostos. Para aumentar a probabilidade da identificação correta deste composto pode-se aplicar o índice de retenção relativo, onde se executa o mesmo procedimento para índice de retenção, porém em duas colunas que empregam mecanismos de separação distintos. Por exemplo, a primeira uma coluna polar e a segunda uma coluna apolar. Calcula-se, a seguir, a relação entre os índices de retenção de cada coluna fornecendo o índice de retenção relativo para este composto com relação à série homóloga de alcanos.

Nem sempre é possível utilizar uma série homóloga de alcanos, assim, utiliza-se como opção um composto determinado como padrão, o qual servirá como marcador dos tempos de retenção. Dessa forma o cálculo envolvido retornará um valor numérico demonstrando a relação entre o composto de interesse e o composto padrão. Esta técnica é denominada retenção relativa. Quanto maior for o número de retenções relativas em diferentes colunas, maior a confiabilidade na determinação de compostos.

Além da identificação através de índice de retenção e retenção relativa, pode-se utilizar a técnica de espectrometria de massas, a qual analisa os fragmentos obtidos da decomposição estrutural de um composto.



Como pode ser visto, a identificação do composto é uma tarefa árdua que exige muito tempo de dedicação e conferência em bases bibliográficas à procura de compostos segundo os tempos de retenção, índice de retenção, retenção relativa e espectros de massa. Criando-se bancos de dados específicos para diversas classes de compostos pode-se facilitar o trabalho de identificação dos mesmos, sendo esse trabalho passível de uma agilização maior se for utilizado um programa para localização dos compostos no banco de dados.

Desta maneira foi criado um software com o objetivo de ser capaz de editar, inserir, pesquisar e fornecer as probabilidades de identificação de compostos segundo a utilização de índices de retenção, índices de retenção relativa e espectro de massas relacionados a banco de dados específicos coletados da literatura ou obtidos experimentalmente. (Figura 5).

Este programa foi utilizado com sucesso ao longo de um Projeto Temático de longa duração (quatro anos) no laboratório de cromatografia. O projeto estava relacionado com o desenvolvimento de metodologias e equipamentos voltados para a identificação e quantificação de poluentes orgânicos na matriz água.

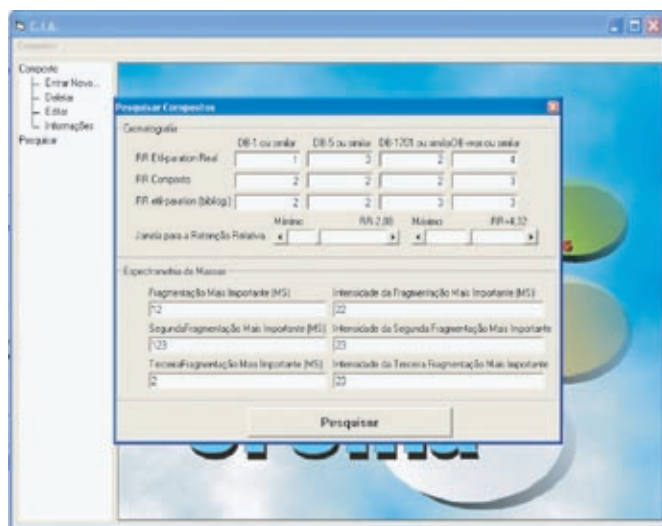


Figura 5. Telas do programa de CIA para identificação de compostos

Validação de Metodologias Analíticas via Softwares: VALIDATE (7,8)

A validação tornou-se importante na década de 70, a partir da constatação da enorme variabilidade de resultados obtidos em análises de amostras quando estas são submetidas a estudos interlaboratoriais. Órgãos internacionais então adotaram critérios para garantir a conformidade de resultados obtidos em diferentes laboratórios. Uma destas alternativas foi a criação do sistema ISO/IEC-25.

No Brasil, os sistemas de qualidade vigentes são requisitos básicos para o registro de laboratórios nos principais órgãos de controle do país. Dentre eles destacam-se a Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento (MAPA) e Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). Cada um destes órgãos possui legislação específica e adotam guias para a aceitação da validação das análises efetuadas por seus credenciados ou laboratórios que buscam credenciamento.

Analisando-se a documentação exigida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), verifica-se que cada setor possui normas para credenciamento diferentes uma das outras. Assim, por exemplo, as normas de validação para laboratórios do Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal (DDIV) poderão ser diferentes das normas do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Um exemplo de guia de validação pode ser obtido através da Instrução Normativa SDA N° 46, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, de 10 de Junho de 2003.

Na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as validações de métodos para credenciados e laboratórios em credenciamento devem seguir a Resolução - Re N° 899, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos de 29 de Maio de 2003, que define o cálculo dos seguintes parâmetros: Especificidade, Seletividade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Limite de detecção (sensibilidade), Limite de quantificação, Exatidão e Robustez.

O Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) também possui guias para validação tais como o DOQ-CGCRE-008 (Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos) com revisão de Março de 2003.

Mesmo que o laboratório não esteja credenciado em nenhum órgão oficial, é necessário que os resultados obtidos transmitam a confiança necessária. Sendo assim, a validação do método empregado deve ser executada. O método pode ser baseado em uma norma, em artigos científicos e livros, ou ainda metodologia específica desenvolvida pelo laboratório onde está sendo executada. Validar esta metodologia é parte do processo de valorizar, ou dar valor, ao método adaptado ou desenvolvido. O programa VALIDATE foi criado para auxiliar nesta tarefa. (Figura 6).

O programa possui a análise de parâmetros relevantes na validação de metodologias, incluindo: a precisão, exatidão, determinação dos limites de detecção e de quantificação, além do cálculo da recuperação.

Uma das maiores inovações e características deste programa é a inclusão de um guia de procedimentos para se obter os resultados necessários para o cálculo de cada um dos parâmetros da validação. Assim, caso necessite de ajuda com relação à metodologia, a fim de se obter os respectivos valores em cada parâmetro, existe um botão que o auxilia, passo a passo, na obtenção destes dados.

Ao selecionar a ajuda, uma nova janela será aberta, apresentando, de forma detalhada, todos os passos sobre como proceder experimentalmente. Caso seja necessário algum cálculo durante a execução da metodologia, o programa executa estes cálculos neste respectivo passo, facilitando, assim, o trabalho do usuário.



Seguindo passo a passo os procedimentos, e uma vez concluída a obtenção dos dados e efetuados os cálculos, os mesmos são transferidos para os respectivos campos da janela principal, para o cálculo do parâmetro em questão.

Ao final da validação, o software emite um relatório completo com todos os resultados calculados e obtidos ao longo do processo, o qual pode ser salvo ou mesmo impresso.

A versão Standard do software, descrito neste artigo, é fornecida como parte integrante do livro “Validação de Métodos Cromatográficos” do Prof. Dr. Fernando M. Lanças (8). A versão Professional contempla outros parâmetros de Validação, assim como critérios exigidos pelas principais agências nacionais (ANVISA, MAPA, INMETRO,...) e internacionais (EPA, FDA, OECD,...) de controle da qualidade de dados laboratoriais de análise química estará em breve disponível no mercado.

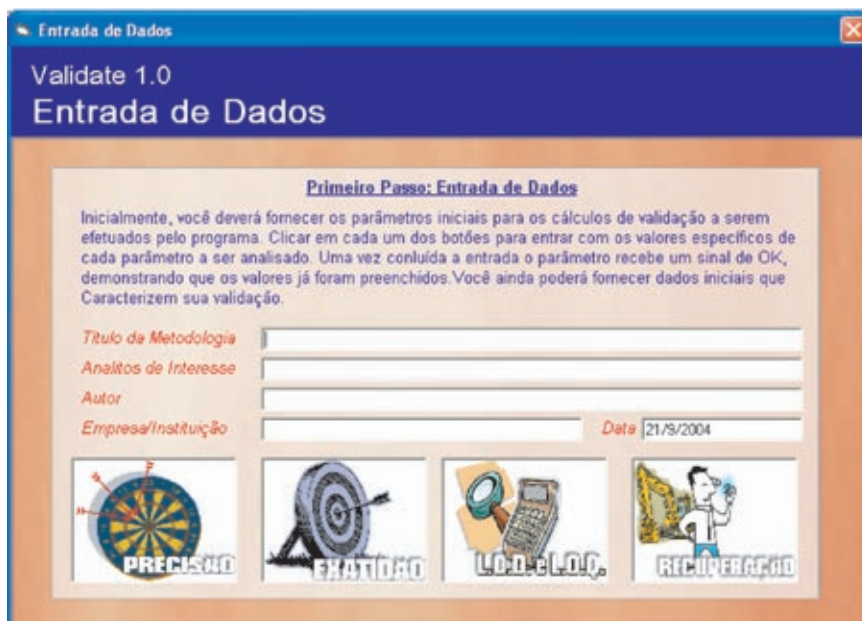


Figura 6. Telas do programa de Validade para identificação de compostos

Referências

- PACCES, VHP; LANÇAS, FM. *Desenvolvimento de Programas de Computação para a Otimização, Simulação e Análise Cromatográfica*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2000.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM. *Software para Análise da Qualidade de Colunas Cromatográficas*. COLACRO VII – Congresso Latino Americano de Cromatografia. Águas de São Pedro, SP, Brasil. 25/março/1998.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM. *Simulação do Tempo de Retenção em Cromatografia Via Software*. X ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica. Santa Maria, RS, Brasil. agosto/1999.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM. *Estudo Sobre Simulação Cromatográfica em Compostos Diversos Variando-se Temperatura da Coluna e Velocidade Linear Média da Fase Móvel*. COLACRO VIII - Congresso Latino Americano de Cromatografia. Buenos Aires, Argentina. março/2000.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM. *Software for Chromatographic Simulation - SIMCROM*. XXIII International Symposium on Capillary Chromatography. Riva Del Garda, Itália. junho/2000.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM; OLIVARES, IRB. *C.I.A. (Compounds' Identifier and Analyzer)*. COLACRO X – 10º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins. Campos do Jordão, Brasil. outubro/2004.
- PACCES, VHP; LANÇAS, FM; COUTINHO, L. *Programa para Auxiliar na Validação de Metodologias*. COLACRO X – 10º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins. Campos do Jordão, Brasil. outubro/2004.
- LANÇAS, FM. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. Rima Editora. 2004