

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA CONTROLE DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Caio Heitor Bressan de Oliveira¹; Edmilson Renato de Castro², Renata Borges do Nascimento²

¹ Aluno de Iniciação Científica do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT);

² Professor do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT).

Resumo. *Este artigo apresenta uma metodologia para a quantificação das substâncias presentes na reação de esterificação do salicilato de metila, empregando a espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS). Atualmente, é muito utilizada a cromatografia para a análise de amostra, que possui uma demanda de aproximadamente 22,5 min para cada análise. Com o uso do NIR esse tempo pode ser reduzido para entorno de 30 s. O artigo desenvolve um modelo de calibração para o ácido salicílico e outro para o salicilato de metila, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) como método primário (utilizado para a calibração do modelo no NIR). Foi obtido para os métodos primários do ácido salicílico e do salicilato de metila coeficientes de correlação de 1,00 e 0,987, respectivamente; para o método no NIR, foi obtido para o ácido salicílico e salicilato de metila um coeficiente de correlação de 0,999 e 1,00, respectivamente. O método não conseguiu identificar as concentrações das substâncias quando estão em mistura, porém, foi possível quantificar as substâncias quando estão apenas em presença de acetonitrila.*

Introdução

As ligações covalentes em moléculas vibram constantemente. Elas possuem movimentos tanto axiais como angulares. As deformações axiais ocorrem na linha de sua ligação, podendo comprimir ou esticar a ligação, enquanto as deformações angulares ocorrem em moléculas que possuem três ou mais átomos. (Bruice, 2006)

A energia associada a cada vibração das ligações é quantizada e apenas alguns estados energéticos são permitidos à molécula. Para a molécula absorver radiação do infravermelho a ligação precisa ser polar e a energia transferida precisa gerar uma variação do momento de dipolo local na ligação da molécula. (Brown & Foote, 1998)

A espectroscopia é o ramo da ciência que utiliza o método analítico para estudar as interações entre as moléculas e a radiação. A análise pode ser feita a partir de um espectrômetro, que utiliza o comprimento de onda emitida para analisar uma amostra. O espectro eletromagnético se estende por uma larga faixa de energia, possibilitando inúmeras formas de interação da radiação com a molécula, uma dessas formas está relacionada a absorção da radiação pela molécula em uma determinada frequência (Tibola, 2018).

Existem diversos tipos de radiações utilizadas para a análise de uma molécula, essas radiações podem ser divididas pelos seus números de onda que representa onde que essa radiação pode ser visualizada. A região do infravermelho que se situa entre os números de onda 10000-4000 cm^{-1} é conhecida como região do infravermelho próximo (NIR), que em conjunto com a quimiometria tem sido reconhecida como uma técnica analítica muito promissora para a obtenção e análise de espectros de absorbância.

A quimiometria é definida como a ciência que relaciona medições feitas em um processo químico com o estado do sistema por meio de aplicações de métodos matemáticos e/ou estatísticos (IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry). Existem diversos métodos quimiométricos, um deles é a calibração multivariada, os principais métodos desta calibração são: regressão em componentes principais (PCR), regressão linear múltipla (RLM) e mínimos quadrados parciais (PLS).

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y). Quando existe apenas uma propriedade em estudo, y é um vetor e, neste caso, o método é denominado PLS 1. A propriedade de interesse muitas vezes é a concentração de um analito, porém não se limita somente a esta, podendo até mesmo abranger propriedades físico-químicas, tais como densidade e viscosidade, as quais são relacionadas a composição da amostra. (Souza, 2013).

A reação de formação do salicilato de metila consiste em uma reação de esterificação que tem como reagentes o ácido salicílico e o metanol e como catalisador o ácido sulfúrico. O salicilato de metila é um composto químico muito utilizado pela indústria farmacêutica (composto utilizado na formulação do Gelol).

Para um bom modelo de calibração, é interessante o uso de um método primário como assistência para o método principal. O método primário é utilizado como um método de validação para os dados obtidos no trabalho. Neste caso, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), que junto com uma fase móvel adequada, realiza a separação dos componentes em uma amostra, sendo então, um método primário muito confiável para a presente pesquisa.

Portanto, a presente pesquisa tem como objetivo realizar uma curva de calibração para a reação de formação do salicilato de metila, utilizando um espectrofotômetro do infravermelho próximo (NIR) como método principal e utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) como método primário. Ainda, a presente pesquisa tem como objetivo otimizar o tempo de análise de amostras da reação de formação do salicilato de metila, substituindo o HPLC pelo NIR, com isso, é esperado uma redução de tempo de análise de amostras de aproximadamente 30 min para 30 s.

Material e Métodos

Materiais

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Agilent Technologies 1260 Infinity (Figura 1), com descrição apresentada na tabela 1 e um espectrofotômetro do infravermelho próximo (NIR) Thermo Scientific modelo Nicolet iS5N FT-NIR com o acessório Thermo Fisher iD1 Transmission (Figura 2), com descrição apresentada na tabela 2.

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros do HPLC

| | |
|---|---------------------|
| Modelo da coluna | Varian C18 |
| Tamanho da coluna | 25 cm |
| Fase da coluna | Reversa |
| Fase móvel | Acetonitrila |
| Temperatura da coluna | 20 °C |
| Volume de amostra injetada | 2 µL |
| Comprimento de onda | 305,4 nm |
| Software de aquisição/tratamento dos espectros | Open Lab (vA.01.03) |

Tabela 2 – Descrição dos parâmetros do NIR

| | |
|--|-------------------------------------|
| Número de Scans | 32 |
| Formato Final | Absorbância |
| Resolução | 8 |
| Software de aquisição dos espectros | OMINIC™ (Thermo Fischer Scientific) |
| Software de análise estatística | TQ Analyst |

Figura 1 – Cromatógrafo líquido de alta eficiência



(1) Compartimento para amostras; (2) coluna; (3) frascos com soluções de limpeza e fase móvel

Figura 2 – Espectrofotômetro Nicolet iS5N FT-NIR



(2) Espectrômetro Nicolet iS5N FT-NIR; (2) acessório iD1 Transmission

As substâncias utilizadas para a pesquisa foram o salicilato de metila, o ácido salicílico, a acetonitrila, o metanol e o ácido sulfúrico. Foi utilizado o salicilato de metila fornecido pela empresa Merck com concentração de 99 %, o ácido salicílico foi utilizado da empresa Synth com concentração de 99 %, a acetonitrila foi utilizada da empresa Sigma-Aldrich com concentração de 99,9 %, o metanol com concentração 99,99 % fornecido pela empresa Merck e o ácido sulfúrico da empresa Synth com concentração 98 %.

Para as curvas de calibração, foram utilizados os seguintes equipamentos: uma balança analítica da marca Shimadzu, balões volumétricos de 10 ml, pipetas Pasteur de vidro, béqueres de vidro de tamanhos variados e espátulas de tamanho pequeno e grande.

Para o ácido salicílico, foi preparada uma curva de calibração utilizando soluções com diferentes concentrações representados pela tabela 3. As soluções preparadas também foram diluídas para utilização na curva de calibração no HPLC, que apresenta uma sensibilidade muito alta, então deve-se usar baixas concentrações.

Também foi feito um modelo de calibração para o NIR para o salicilato de metila, sendo os pontos da curva representadas pela tabela 4, utilizando balões volumétricos de 25 ml. Estes

pontos são diluídos para concentrações 10 vezes menor para a curva de calibração no HPLC. As curvas de calibração do ácido salicílico e do salicilato de metila foram avolumadas com acetonitrila, que é a fase móvel utilizada no HPLC, o uso da acetonitrila se fez necessários pois os compostos não são solúveis em água.

Tabela 3 – Massa utilizada para a curva de calibração do ácido Salicílico

| Ponto | Ácido Salicílico (g) (Concentrado) | Concentração (%) | Ácido Salicílico (g) (Diluído) | Concentração (%) |
|-------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------|
| 0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 1 | 0,101 | 1,01 | 0,0101 | 0,101 |
| 2 | 0,201 | 2,01 | 0,0200 | 0,200 |
| 3 | 0,300 | 3,00 | 0,0300 | 0,300 |
| 4 | 0,401 | 4,01 | 0,0402 | 0,402 |
| 5 | 0,505 | 5,05 | 0,0504 | 0,504 |
| 6 | 0,605 | 6,05 | 0,0606 | 0,606 |
| 7 | 0,704 | 7,04 | 0,0702 | 0,702 |
| 8 | 0,805 | 8,05 | 0,0804 | 0,804 |
| 9 | 0,905 | 9,05 | 0,0904 | 0,904 |
| 10 | 0,999 | 9,99 | 0,100 | 1,00 |

Tabela 4 – Massa utilizada para a curva de calibração do salicilato de metila

| Ponto | Salicilato de Metila (g) | Concentração (%) | Concentração (%) (Diluído) |
|-------|-----------------------------|------------------|-------------------------------|
| 0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 1 | 0,255 | 1,02 | 0,102 |
| 2 | 0,494 | 1,98 | 0,198 |
| 3 | 0,755 | 3,02 | 0,302 |
| 4 | 0,998 | 3,99 | 0,399 |
| 5 | 1,26 | 5,02 | 0,502 |
| 6 | 1,50 | 6,01 | 0,601 |
| 7 | 1,76 | 7,03 | 0,703 |
| 8 | 2,00 | 8,02 | 0,802 |
| 9 | 2,26 | 9,03 | 0,903 |
| 10 | 2,51 | 10,0 | 1,00 |

Operação do HPLC e NIR

O HPLC é um equipamento muito sensível, por isso, as amostras devem ser preparadas para ter a menor quantidade de impurezas possível, então, as vidrarias utilizadas devem sempre estar limpas antes do uso e o usuário deve tomar o máximo de cuidado possível para evitar as impurezas. As amostras feitas em balões volumétricos devem ser introduzidas em vials, estes, são colocados dentro do HPLC para a análise das amostras.

A tabela 5 ilustra o método cromatográfico realizado no HPLC. A leitura do detector de arranjo de diodo foi na faixa de 210 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 236 nm. A identificação do salicilato foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de ultra-violeta com o padrão de referência (Salicilato de Metila Vetec®, dosagem mínima 99 %), além de dados da literatura.

A quantificação do salicilato de cada amostra foi feita por correlações com curvas de calibração com padrão externo por meio de injeções em duplicata sob melhores condições cromatográficas.

Tabela 5 – Método cromatográfico HPLC

| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | MeCN (%) | H ₂ O (%) |
|-------------|----------------|----------|----------------------|
| 0,0 | 0,7 | 50,0 | 50,0 |
| 5,0 | 0,7 | 50,0 | 50,0 |
| 15,0 | 1,0 | 60,0 | 40,0 |
| 15,1 | 1,0 | 90,0 | 10,0 |
| 18,0 | 1,0 | 90,0 | 10,0 |
| 18,1 | 1,0 | 50,0 | 50,0 |
| 22,0 | 1,0 | 50,0 | 50,0 |

O NIR, assim como o HPLC, é um equipamento muito sensível, quaisquer impurezas na amostra podem afetar significativamente o resultado obtido. Por isso, suas amostras devem ser preparadas com muito cuidado. No NIR, para a análise da amostra é utilizado uma cubeta de quartzo que possui 1,00 cm de caminho óptico. Essa cubeta deve ser limpa sempre antes da análise das amostras.

Curva de calibração do ácido salicílico e do salicilato de metila

Para o início do procedimento, os balões volumétricos de 10 ml foram preenchidos com ácido salicílico com a ajuda de uma espátula, utilizando os pontos da tabela 3, e então, após a pesagem, foi utilizada uma pipeta Pasteur de vidro para os balões volumétricos serem avolumados com a acetonitrila.

Após o preparo dos balões volumétricos, estes foram diluídos e levados ao cromatógrafo de alta eficiência (HPLC). O HPLC, deve ser preparado com antecedência para não haver impurezas na sua coluna nem pequenas bolhas em sua tubulação. Ainda, no HPLC foi injetado aproximadamente 2 µL para a análise das amostras.

Após a análise no HPLC, as amostras concentradas foram analisadas no NIR. Com o NIR, previamente ligado e estabilizado, foi realizada a uma leitura sem a cubeta introduzida (*background*), após o *background*, foi feita uma ambientação da cubeta utilizando as amostras, então foi realizada a leitura das amostras utilizando o software OMINIC. Para essa análise, a mesma cubeta preenchida foi analisada 3 vezes, então o conteúdo foi descartado e outra análise da mesma amostra foi conduzida, sendo realizada em triplicata para cada balão volumétrico da tabela 3.

Para a curva de calibração do salicilato de metila os métodos foram os mesmos utilizados no ácido salicílico, utilizando balões volumétricos de 10 ml que foram avolumados com acetonitrila, que também foi utilizada para medir as massas dos pontos da tabela 3, já que o salicilato de metila é líquido diferentemente do ácido salicílico.

Então, os espectros de absorvância das amostras de ácido salicílico e salicilato de metila foram obtidas. Com os espectros obtidos de todos os pontos das tabelas 3 e 4, os espectros foram transferidos para o software TQ Analyst, em que, para cada ponto foi atribuído a sua porcentagem, de acordo com as tabelas 3 e 4, que são necessárias para a calibração e validação do modelo.

Para a calibração dos métodos, pelo software TQ Analyst, deve-se selecionar pelo menos uma região do espectro de absorvância das amostras, em que, haja variação da absorvância devido ao aumento de concentração das amostras.

Resultados e Discussão

Curva de calibração do método primário

O cromatógrafo de alta eficiência (HPLC) consegue calcular a área do pico obtido referente a substância analisada, assim, a cada concentração utilizada (de acordo com as tabelas

3 e 4) pode ser relacionada a sua área, sendo que, quanto maior a concentração da amostra, maior será a área obtida. Na figura 3 e na figura 4, podem ser analisadas as curvas de calibração utilizadas como método primário.

Como determinado pelo método, o cromatógrafo de alta eficiência teve um tempo de análise de 30 min para cada amostra, totalizando 5 horas para a análise de todas as amostras, é importante ressaltar que se o tempo de análise for diminuído, a precisão do equipamento cairá, por isso foram utilizadas 30 min.

Figura 3 – Curva de calibração do método primário do ácido salicílico

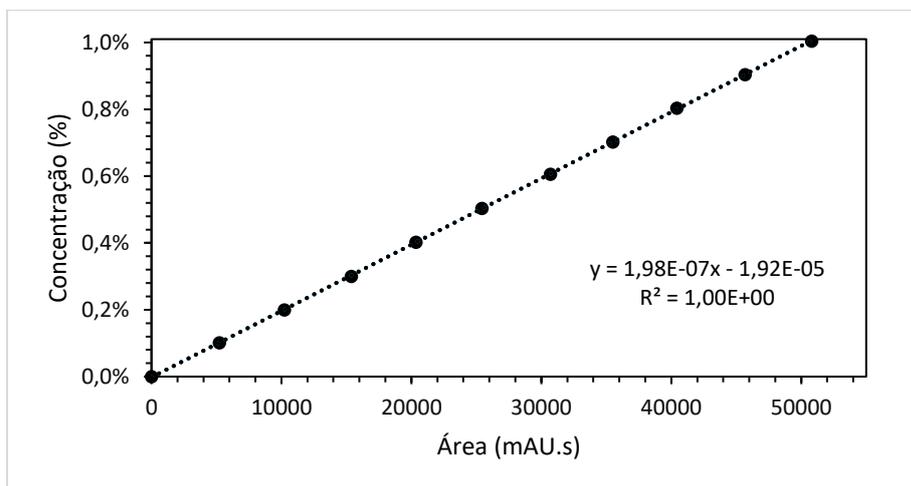
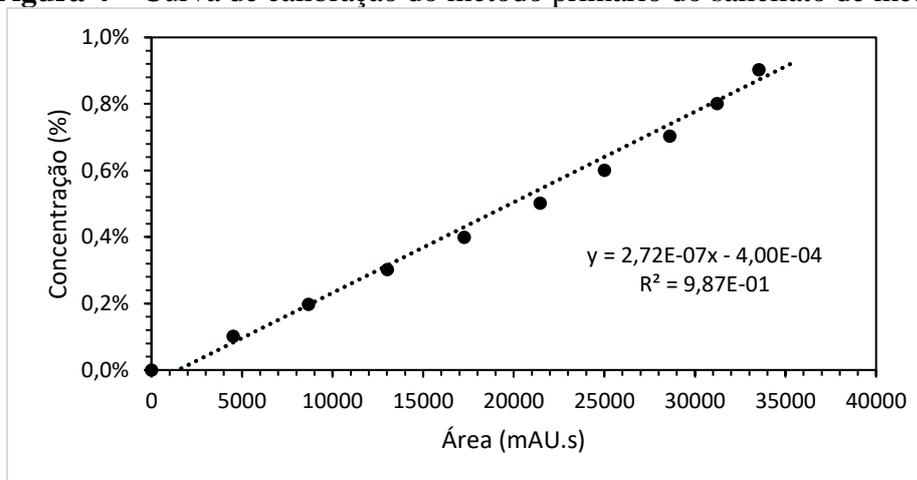


Figura 4 – Curva de calibração do método primário do salicilato de metila



Pela Figura 3, pode ser percebido que a curva de calibração realizada com o método primário (HPLC) ficou com uma precisão muito boa, obtendo um coeficiente de determinação de aproximadamente 1. Enquanto a Figura 4, não ficou totalmente ajustada, obtendo um coeficiente de determinação de 0,987.

O erro apresentado na curva de calibração do salicilato de metila pode decorrer de diversos fatores, podendo ser a presença de muitas bolhas na tubulação do HPLC, também podendo conter erro quando avolumado com acetonitrila.

Modelo de calibração do método principal

Na curva de calibração do NIR, foram obtidos os espectros de absorvância do ácido salicílico e do salicilato de metila, que ficaram muito similares, por as substâncias estarem diluídas igualmente na acetonitrila.

As regiões escolhidas no software TQ Analyst estão indicadas pelas figuras 5 e 6. Para o ácido salicílico foi selecionada a região entre 6051-4940 cm^{-1} , para o salicilato de metila foram selecionadas as regiões entre 5203-4346 cm^{-1} e 6676-6284 cm^{-1} . As regiões são utilizadas para formar as curvas de calibração do ácido salicílico e do salicilato de metila, figuras 7 e 8.

Figura 5 – Região selecionada para a construção do modelo do ácido salicílico

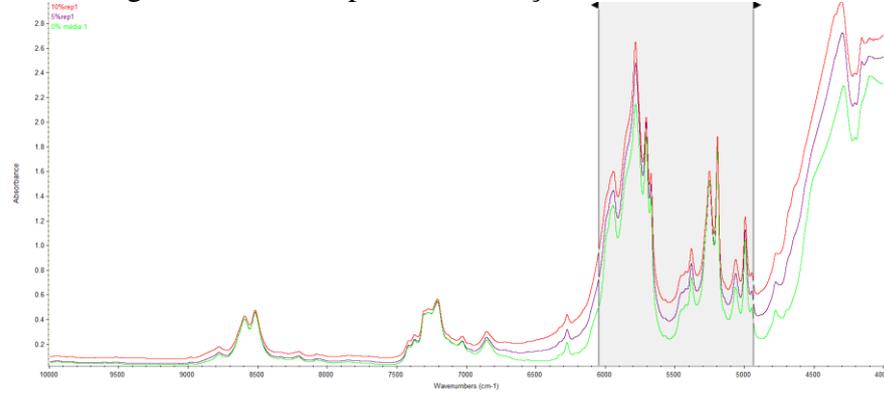


Figura 6 – Regiões selecionadas para a construção do modelo do salicilato de metila

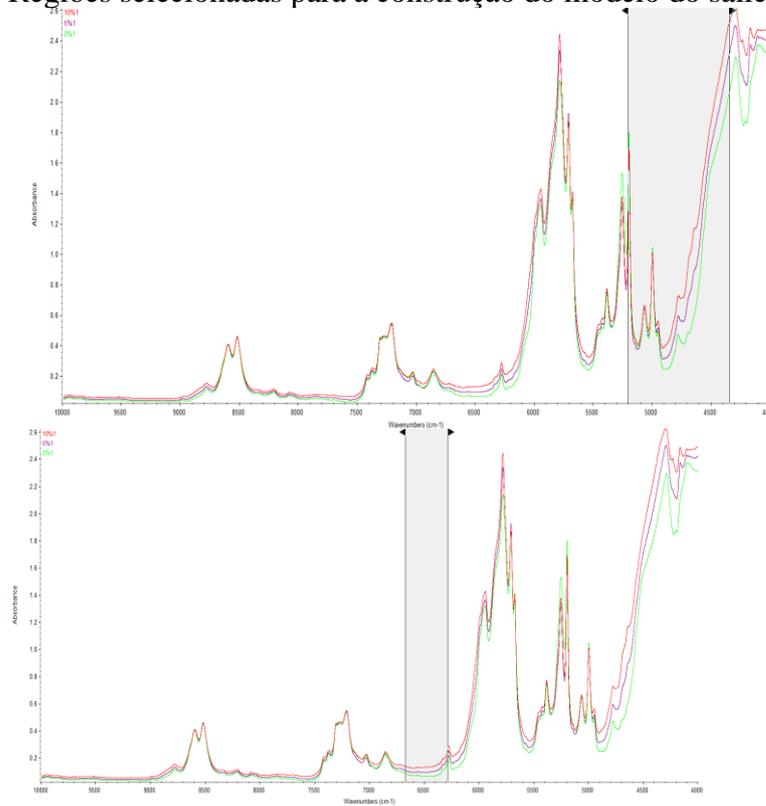


Figura 7 – Curva de calibração do ácido salicílico

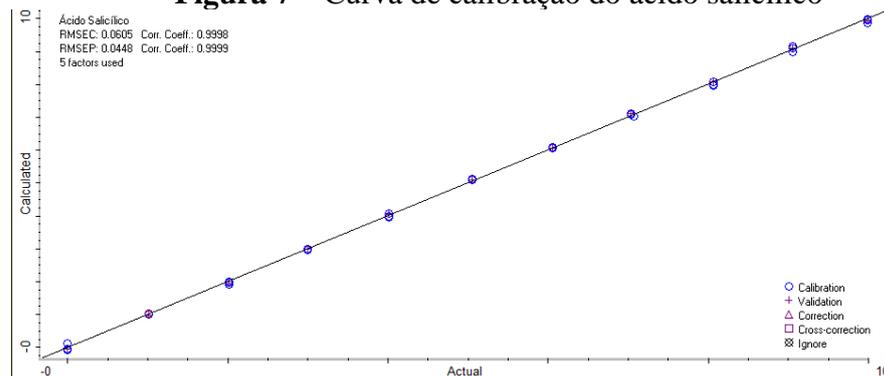
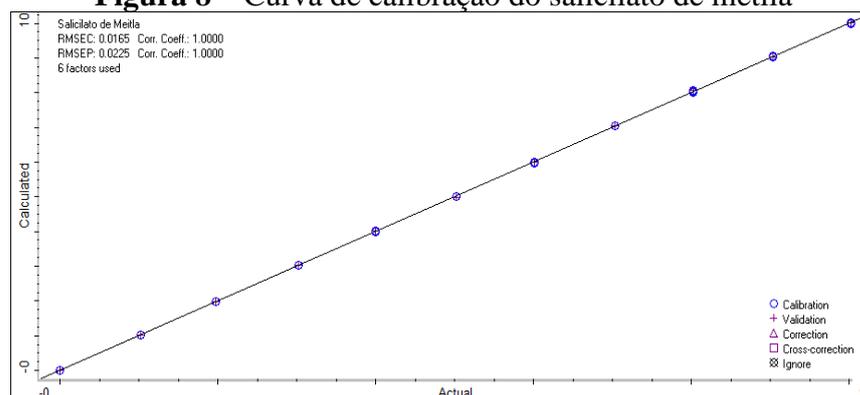


Figura 8 – Curva de calibração do salicilato de metila

Pelas figuras 7 e 8, pode-se dizer que as duas curvas de calibração apresentaram um bom coeficiente de determinação (R^2) e um bom RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração). Porém, a diferença dos pontos da curva do ácido salicílico (figura 7) foram entre -0,12 e 0,14, que é relativamente alto, enquanto do salicilato de metila foi entre -0,04 e 0,05, a diferença significa o quão distante a concentração resultante pela curva de calibração pode estar da concentração real da amostra.

Para a validação do método para as substâncias puras foram feitas 10 amostras com pontos de concentração diferentes dos feitos nas tabelas 3 e 4. Os resultados da validação são representados pelas tabelas 6 e 7, em que, o erro 1 representa a concentração obtida no NIR comparada com a concentração medida experimentalmente e o erro 2 o erro da concentração medida no NIR em relação ao medido no HPLC.

Tabela 6 – Validação do método do ácido salicílico para substância pura

| C preparada (%) | C HPLC (%) | C NIR (%) | Erro 1 (%) | Erro 2 (%) |
|-----------------|------------|-----------|------------|------------|
| 0,65 | 0,65 | 0,59 | 9,23 | 9,23 |
| 1,18 | 1,21 | 1,09 | 7,63 | 9,92 |
| 2,45 | 2,53 | 2,51 | 2,45 | 0,790 |
| 3,28 | 3,32 | 3,37 | 2,74 | 1,51 |
| 4,38 | 4,43 | 4,53 | 3,42 | 2,26 |

Tabela 7 – Validação do método do salicilato de metila para substância pura

| C preparada (%) | C HPLC (%) | C NIR (%) | Erro 1 (%) | Erro 2 (%) |
|-----------------|------------|-----------|------------|------------|
| 0,81 | 0,510 | 0,820 | 1,23 | 37,8 |
| 2,40 | 2,45 | 2,44 | 1,67 | 0,408 |
| 3,19 | 3,31 | 3,24 | 1,54 | 2,11 |
| 4,38 | 4,68 | 4,45 | 1,60 | 4,91 |
| 5,20 | 5,61 | 5,25 | 0,961 | 6,42 |

Também foi realizada uma validação para o método utilizando o ácido salicílico e o salicilato de metila em conjunto com a acetonitrila, representando o desenvolvimento de uma reação de esterificação de forma teórica, em que, 1 mol de ácido salicílico produz 1 mol de salicilato de metila. Porém, o resultado dessa validação não apresentou um bom resultado, não retornando os valores reais de concentração das substâncias presentes nas amostras, por isso, o resultado não é inserido na presente pesquisa.

Ainda, foi feito uma análise de repetibilidade das curvas de calibração, sendo a tabela 8 para o ácido salicílico e a tabela 9 o salicilato de metila. Com essa análise é possível saber se a curva de calibração retorna os valores corretos para uma mesma concentração repetida 6 vezes.

Tabela 8 – Análise de repetibilidade da curva do ácido salicílico

| C medida (%) | C NIR (%) | Erro (%) | Desvio padrão | Coefficiente de Variação (%) |
|--------------|-----------|----------|---------------|------------------------------|
| 1,04 | 0,98 | 5,77 | 0,03 | 2,65 |
| 4,03 | 4,26 | 5,66 | 0,03 | 0,72 |
| 7,02 | 6,95 | 1,00 | 0,04 | 0,54 |

Tabela 9 – Análise de repetibilidade da curva do salicilato de metila

| C medida (%) | C NIR (%) | Erro (%) | Desvio padrão | Coefficiente de Variação (%) |
|--------------|-----------|----------|---------------|------------------------------|
| 1,02 | 1,07 | 4,90 | 0,03 | 2,56 |
| 4,02 | 4,11 | 2,24 | 0,05 | 1,16 |
| 8,01 | 7,95 | 0,75 | 0,04 | 0,50 |

Por último, foi feita uma análise verificando o limite de detecção das curvas de calibração, nesta análise é verificado qual a menor concentração que o NIR consegue retornar de uma amostra. A tabela 10 representa a análise de limite de detecção do ácido salicílico e do salicilato de metila.

Tabela 10 – Análise de limite de detecção do ácido salicílico e salicilato de metila

| Substância | C medida (%) | C NIR (%) | Erro (%) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação (%) |
|----------------------|--------------|-----------|----------|---------------|------------------------------|
| Ácido Salicílico | 0,61 | 0,60 | 1,47 | 0,03 | 4,75 |
| Salicilato de Metila | 0,52 | 0,49 | 5,20 | 0,008 | 1,53 |

Conclusões

Com o método construído, não é possível quantificar as substâncias da reação de esterificação do salicilato de metila quando estão misturadas. Isso acontece porque o NIR apresenta picos amplos que se sobrepõem, então, para o ácido salicílico e o salicilato de metila que são substâncias muito semelhantes e o NIR não conseguiu encontrar regiões em que os picos não estão sobrepostos, assim, o método não foi validado. Porém, o método pode ser utilizado para quantificar o ácido salicílico e o salicilato de metila quando estes estão puros.

Mesmo com os altos coeficientes de determinação (R^2), pode-se dizer que o erro apresentado para o ácido salicílico no NIR foi relativamente alto, o que é justificado pela alta variação apresentada para os pontos ($-0,12 < C < 0,14$). Enquanto para o salicilato de metila, o erro apresentado no NIR foi baixo, porém foi obtido um alto erro dessa substância no método primário (HPLC).

Por último, é possível dizer que o método construído consegue identificar uma concentração mínima de 0,6 % para o ácido salicílico e de 0,5 % para o salicilato de metila.

Referências Bibliográficas

Brown, W. H.; Foote, C. S. *Organic Chemistry*. 2. ed. Orlando, Florida: Saunders College Publishing, 1998.

Bruice, P. Y. *Química orgânica*. 4. ed. São Paulo: Person Education do Brasil, 2006.

Tibola, C. S.; et al. *Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos*. EMBRAPA, 2018. Cap. 1 “Princípios da Espectroscopia no Infravermelho Próximo”.

Souza, A.M.D., et al. (2013) Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, 36,1057-1065.