



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



SILMARA LEONCIO BRAGA

**GUIA PARA DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS POR
CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO
DE FÁRMACOS**

OURO PRETO – MG

2018

SILMARA LEONCIO BRAGA

**GUIA PARA DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS POR
CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO
DE FÁRMACOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Jacqueline de
Souza

OURO PRETO
2018

B813g Braga, Silmara Leoncio.
Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos [manuscrito] / Silmara Leoncio Braga. - 2018.

63f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jacqueline Souza.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Medicamentos- Análise. I. Souza, Jacqueline. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 543.544.5

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



TERMO DE APROVAÇÃO

Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **SILMARA LEÔNCIO BRAGA**, matrícula 14.1.2137 em 03 de julho de 2018, e aprovado pela comissão examinadora:

Prof. Dra. Jacqueline de Souza
Orientadora, DEFAR-EF-UFOP

Prof. Dr. Mauricio Xavier Coutrim
DEQUI-ICEB-UFOP

MSc. Tamires Guedes Caldeira
CIPHARMA - UFOP

Dedico o presente trabalho aos meus pais, Silvestre e Maria, que me inspiram a cada dia a ser uma pessoa melhor e a sempre fazer o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por permitir que eu conseguisse chegar ao final dessa jornada.

Aos meus pais Silvestre e Maria, por seu amor incondicional, por sempre me apoiarem e por fazerem o possível e o impossível para que eu conseguisse mais essa conquista. A vocês eterna gratidão e amor.

Aos meus irmãos, Samuel, Filipe e Estevão, por serem essas pessoas que fazem a diferença, por me ensinarem muitas coisas sobre a vida, por sempre me apoiarem e me ajudar. Obrigada pela proteção. Vocês são sensacionais.

Não podia deixar de agradecer também às minhas cunhadas, por todo incentivo.

À minha orientadora, Jacqueline, por ser uma grande mestra e uma inspiração para mim. Muito obrigada pelos ensinamentos, e pela paciência durante todo o processo de elaboração desse trabalho.

À Escola de Farmácia, que mesmo em meio a tantas dificuldades, contribuiu positivamente para minha formação, não só na formação acadêmica, mas também na formação pessoal. Obrigada a todos os professores.

Aos melhores amigos que podia ter feito durante essa graduação, sem vocês essa caminhada teria sido muito difícil e sem graça. Aos meus amigos da vida, por estarem comigo em todos os momentos e sempre me ajudando.

E à Igor Assis, meu companheiro e amigo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação amplamente difundida, e seu princípio é baseado na eluição de uma fase móvel (FM) através de uma coluna recheada com uma fase estacionária (FE). Durante a descoberta de novos fármacos e na avaliação da qualidade e estabilidade de fármacos e medicamentos, métodos de separação e quantificação por CLAE são desenvolvidos ou otimizados. Para se obter um método adequado é necessário, se ter um conhecimento teórico prévio sobre a CLAE e as características físico-químicas do analito ou fármaco, pois assim é possível fazer proposições de FM, FE, fluxo, volume de injeção, tempo total de análise e demais variáveis. A fim de avaliar se um método atende as exigências requeridas para o estudo, existem os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, que fornecem resultados que permitem ajustar as condições analíticas, dentre os quais estão: número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), fator de cauda (TF) e desvio padrão relativo (DPR). Este trabalho visa descrever os parâmetros já existentes para adequação do sistema, as condições cromatográficas mais comumente empregadas, além de comparar as variações durante os procedimentos de desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE por diferentes pesquisadores e de produzir um material bibliográfico com um fluxograma para que seja utilizado em posteriores estudos que necessitem de otimização ou desenvolvimento de um novo método para quantificação de fármaco isolado ou contido em formas farmacêuticas (FF). Para tanto, foram realizadas buscas bibliográficas nas principais bases de dados de periódicos sobre artigos que desenvolveram e otimizaram um método de quantificação por CLAE desde 2008, bem como buscas em livros. Observou-se a existência de diversas variações no procedimento para realização do desenvolvimento ou otimização, empregando diferentes condições, sendo que composição da fase móvel era a que sofria mais variações, e que a fase estacionária, dificilmente era mudada, provavelmente pela não disponibilidade de múltiplas colunas no laboratório onde se realizaram as análises. Ao final, foi possível constatar que não existe uma regra, mas que alguns passos durante os processos foram comuns em grande parte dos estudos, como o fato da escolha de uma FE baseada na estrutura química do analito. Todas as informações obtidas foram compiladas e isso possibilitou a proposição de um fluxograma para direcionar as escolhas de condições analíticas, a partir dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, a fim de agilizar o desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação de fármacos, além de minimizar gastos e geração de resíduos.

Palavras-chave: CLAE, otimização, desenvolvimento analítico, adequação do sistema cromatográfico.

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a widely diffused separation technique, and its principle is based on the elution of a mobile phase (MP) through at the column packed with a stationary phase (SP). During the discovery of new drugs and in the evaluation of the quality and stability of drugs and medicines, methods of separation and quantification by HPLC are developed or optimized. In order to obtain a suitable method, it is necessary to have a previous theoretical knowledge about the HPLC and the physicochemical characteristics of the analyte or drug, since it is possible to make propositions of MP, SP, flow, injection volume, total analysis time, and other variables. In order to evaluate if a method meets the requirements for the study, there are parameters of adequacy of the chromatographic system, which provide results that allow adjusting the analytical conditions, among which are: number of theoretical plates (N), resolution (Rs), tail factor (TF), and relative standard deviation (RSD). The aim of this work was to describe the parameters that already exist for the adequacy of the system, the most commonly used chromatographic conditions, and to compare the variations during the development and optimization of methods by HPLC by different researchers and to produce a bibliographical material with a flowchart to be used in further studies that require optimization or development of a new method for quantification of drug isolated or contained in pharmaceutical forms. For this, bibliographic searches were carried out in the main databases of periodicals about articles that developed and optimized a method of quantification by HPLC since 2008, as well as searches in books. It was observed the existence of several variations in the procedure to carry out the development or optimization, using different conditions, being that the composition of the mobile phase was the one that suffered more variations, and that the stationary phase was hardly changed, probably due to the non-availability of multiple columns in the laboratory where the analyzes were performed. At the end, it was possible to verify there is no rule, but some steps during the processes were common in most of the studies, as the fact of choosing an SP based on the chemical structure of the analyte. All the information obtained was compiled and this enabled the proposition of a flowchart to direct the choices of analytical conditions, from the parameters of adequacy of the chromatographic system, in order to speed up the development of chromatographic method for quantification of drugs, besides minimizing expenses and generation of waste.

Keywords: HPLC, optimization, analytical development, adequacy of the chromatographic system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um cromatógrafo a líquido	21
Figura 2: Descritores de retenção do analito	31
Figura 3: Medições de eficiência (número de pratos teóricos na coluna)	35
Figura 4: Cromatograma representando assimetria do pico	37
Figura 5 adaptada: Definições de assimetria de pico.....	38
Figura 6: Cromatogramas da azitromicina.....	45
Figura 7: Triângulo de seletividade para os solventes.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de FE empregada em separação pelo mecanismos de partição e adsorção.....	43
Tabela 2: Resultado dos testes realizados durante o desenvolvimento do método analítico proposto para quantificação de 3TC, AZT e NVP.....	48
Tabela 3: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico	63

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Lei de Beer-Lambert.....	25
Equação 2: Fórmula para cálculo do tempo de retenção	31
Equação 3: Fórmula para o cálculo do volume de retenção reduzido	32
Equação 4: Fórmula para o cálculo do fator de retenção	32
Equação 5: Fórmula para o cálculo do equilíbrio da distribuição do analito entre as FM e FE	32
Equação 6: Fórmula para o cálculo da seletividade	33
Equação 7: Fórmulas para o cálculo da eficiência	34
Equação 8: Fórmula para o cálculo do volume máximo de injeção na coluna	35
Equação 9: Fórmulas para o cálculo da resolução	36
Equação 10: Fórmula para o cálculo do fator de cauda	36
Equação 11: Fórmula para o cálculo da assimetria de pico.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Seletividade
ACN	Acetonitrila
As	Fator de assimetria
bar	Unidade de pressão
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	Fase reversa
K	Constante de equilíbrio
k	Fator de retenção
L	Comprimento da coluna
l	Litro
mPa.s	Milipascal por segundo
MeOH	Metanol
N	Número de pratos teóricos
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização
Rs	Resolução
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TF	Fator de cauda
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t_R'	Tempo de retenção reduzido
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
V_0	Volume morto
V_R	Volume de retenção
V_R'	Volume de retenção reduzido
w	Largura do pico na linha de base
$w_{h/2}$	Largura do pico à metade da altura

$W_{0,05}$	Largura do pico a 5% da altura do pico
$W_{0,10}$	Largura do pico a 10% da altura do pico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1. Cromatografia a líquido de alta eficiência (clae).....	18
3.2. Sistema cromatográfico	20
3.2.1.Reservatório da fm	21
3.2.2.Bombas de alta pressão	22
3.2.3.Programadores de fm, medidores e controladores de pressão	22
3.2.4.Sistema injetor da amostra	23
3.2.5.Coluna cromatográfica	23
3.2.6.Detector	24
3.2.7.Sistema coletor de dados	26
3.3. Modos de eluição.....	26
3.4. Cromatografia em fase reversa e fase normal	28
3.4.1.CLAE – FN.....	28
3.4.2.CLAE – FR.....	29
3.5. Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico	30
3.5.1.Tempo de retenção (t_R) e fator de retenção (k).	30
3.5.2.Seletividade (α).....	33
3.5.3.Eficiência (N)	34
3.5.4.Resolução (R_s)	36
3.5.5.Fator de cauda (T) e fator de assimetria (A_s)	36
3.6. Aplicações	38
4. MÉTODO.....	40
4.1. Parâmetros utilizados para quantificação de fármacos por CLAE	40
4.2. Desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE	40
4.3. Fluxograma sobre as etapas para desenvolvimento e otimização dos métodos por CLAE para quantificação de fármacos.	41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Parâmetros existentes utilizados para desenvolver um método cromatográfico para quantificação de fármacos	42
5.1.1.FE que será utilizada na análise	42
5.1.2.Composição da fase móvel (FM)	46
5.1.3.Modo de eluição do processo	50
5.1.4.Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico	51
5.2. Desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE	52
5.3. Fluxograma de decisão para desenvolvimento e otimização dos métodos por CLAE	55
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE I	63

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é um método físico-químico de separação em vários estágios, onde uma mistura de componentes, está dispersa ao nível molecular em um líquido, chamado de fase móvel. Essa fase móvel (FM) transporta os analitos uniformemente por entre os poros de um meio fixo, chamado de fase estacionária (FE), dessa forma, os analitos ficam distribuídos entre essas duas fases, que estão intimamente em contato. Como cada analito interage de uma forma distinta com esse meio fixo, observam-se diferentes tempos de migração (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Dentre os diferentes tipos de cromatografia, temos a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), que é amplamente difundida. A CLAE baseia-se na distribuição dos analitos contidos em uma amostra ou matriz entre a FM líquida que é eluída sob alta pressão através de uma coluna cilíndrica contendo a FE. É uma técnica que apresenta consideráveis vantagens quando comparada a outros métodos cromatográficos, dentre eles destaca-se: a possibilidade de aplicação em uma grande variedade de amostras, boa precisão, tempo de análise reduzido, notável sensibilidade, boa reprodutibilidade, além de ser bastante versátil. Durante a descoberta de novos fármacos e na avaliação da qualidade e estabilidade de fármacos e medicamentos, são desenvolvidos métodos de separação e quantificação por CLAE. No entanto, para que se chegue a um método eficiente, rápido e adequado a aplicação pretendida, é necessário, primeiramente, que se compreenda os princípios e a teoria da CLAE. Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico fornecem resultados que permitem ajustar as condições analíticas, e dessa forma gera um método cromatográfico otimizado e mais adequado à finalidade proposta (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.2010) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P.,2006).

Apesar da CLAE ser uma técnica versátil e abrangente, apresenta alguns pontos críticos devido aos parâmetros variáveis que devem ser ajustados e controlados para que se obtenha a separação do analito de interesse, em tempo adequado e produzindo um sinal cromatográfico com características desejáveis e reprodutíveis.

A importância do presente trabalho consiste em reunir as principais informações sobre os parâmetros que devem ser avaliados em um método cromatográfico quantitativo para fármacos, como estes parâmetros podem ser variados, quais as interferências que estas variações podem acarretar na quantificação de fármacos e propor um guia sobre a condução dos testes ou procedimentos básicos para desenvolver e otimizar métodos por CLAE.

Assim sendo, este trabalho visa contribuir para tornar o processo de desenvolvimento e otimização de métodos analíticos por CLAE menos dispendioso, reduzindo a quantidade de reagentes e solventes que são utilizados, conseqüentemente amenizando a geração de resíduos nocivos, bem como tornar o processo mais rápido e eficiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Elaborar um guia para desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE utilizados na quantificação de fármacos isolados ou contidos em medicamentos.

2.2. Objetivos específicos

- I. Buscar na literatura os parâmetros já existentes e utilizados para quantificação de fármacos por CLAE.
- II. Descrever e analisar, como as condições cromatográficas podem variar e influenciar a quantificação de fármacos.
- III. Elaborar um guia com procedimentos para desenvolvimento e otimização dos métodos por CLAE para quantificação de fármacos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

A palavra cromatografia vem do grego, onde “chroma” (cor) e “graphein” (escrita), escrita da cor, remetem aos primeiros métodos cromatográficos, onde a separação de compostos se baseava na diferença de cor. A descoberta da técnica é atribuída ao botânico Michael Tswett no século XX. A cromatografia a líquido consiste em um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura. O processo ocorre quando a fase móvel (FM), que transporta os analitos, passa através de uma fase estacionária. As diferentes interações que ocorrem entre os analitos e as fases, leva a tempos de migração distintos para cada componente da amostra (COLLINS, C., 2009) (HARVE, D., 2000) (GONÇALVES, A.; 2011) (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007) A FM é composta por um líquido e a FE pode ser sólida ou um líquido adsorvido em um suporte sólido (COSKUN, O., 2016).

Existem diferentes tipos de cromatografia, mas o foco do presente trabalho será a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), uma técnica de separação baseada na distribuição de uma mistura entre duas fases imiscíveis, que são: a fase móvel constituída por um solvente líquido que carrega a amostra solubilizada e elui sob altas pressões, e a fase estacionária, contida na coluna cilíndrica (BRASIL,2010) (COLLINS, C.; GUIMARÃES, L.,1988).

A CLAE é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição, utilizada para detectar, quantificar e purificar substâncias em diferentes matrizes de amostras, advindas de materiais orgânicos, inorgânicos ou biológicos (SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F., 2005) (KUMAR D.; KUMAR H., 2012). Além disso, apresenta vantagens consideráveis sobre os demais métodos de separação e análise de misturas químicas, tais como: 1) a possibilidade de aplicação em grande variedade de amostras; 2) alta precisão e resolução dos resultados obtidos; 3) tempo de análise reduzido, ao comparar com outras técnicas cromatográficas; 4) notável sensibilidade, devido à disponibilidade de detectores cada vez mais sofisticados; 5) boa reprodutibilidade (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.2010) (BRASIL, 2010) (COLLINS,C.; BRAGA G.; BONATO P.,2006).

Os mecanismos de separação dependem intimamente das interações que ocorrem entre o analito e a FM e a FE, e podem se dar por processos físicos,

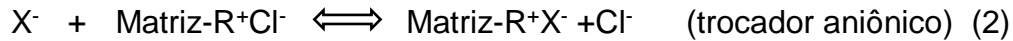
químicos ou mecânicos. Os principais tipos são: adsorção, troca iônica, partição, exclusão por tamanho, afinidade ou interações estereoquímicas, e são dependentes da natureza química das substâncias que serão separadas e de aspectos relacionados com a composição e vazão da fase móvel e a composição da fase estacionária. Os compostos que apresentam maior interação com a fase móvel são eluídos mais rapidamente, e aqueles que apresentam maior afinidade pela fase estacionária, ficarão retidos e terão tempo de eluição maior (ZOTOU, A., 2012) (BRASIL, 2010).

A CLAE que emprega a partição como mecanismo de separação é uma das mais utilizadas. Nela, ambas as fases, estacionária e móvel são compostas por líquidos imiscíveis entre si. A técnica pode ser subdividida em cromatografia líquido-líquido, cujo princípio é baseado nas diferenças de solubilização dos componentes da amostra entre as duas fases, e há também a cromatografia a líquido por partição com fase ligada, que difere-se pelo fato da FE estar imobilizada; assim, na primeira o líquido é imobilizado por adsorção física e na segunda ocorre a retenção por meio de ligações químicas (SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J., 2005) (SNYDER, L., KIRKLAND, J., DOLAN, J.2010).

Na cromatografia por adsorção ocorre uma competição entre as moléculas da amostra e da FM para ocupar os sítios ativos da FE, e adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a FM, por causa dos grupos ativos contidos em sua superfície. Para que o analito seja adsorvido na FE é necessário que a molécula da FM se desloque. Por exemplo, se a superfície adsorvente apresentar características polares, os grupos apolares apresentarão baixa afinidade e assim não vão conseguir mover a molécula da FM, logo não serão retidos; os compostos polares e os grupos polarizáveis, formarão ligações de hidrogênio com essa superfície e assim ficarão retidos. Dessa forma conclui-se que, a polarização dos compostos irá afetar o tempo de retenção destes, com consequente alteração do tempo de eluição (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P.,2006).

Na cromatografia por troca iônica, a FE é uma resina com grupos iônicos adsorvidos que possuem em sua estrutura contra-íons, esses por sua vez, poderão ser deslocados pelos íons opostos presentes na amostra. A FM, tem o mesmo tipo de carga que o soluto e, portanto, compete com o íon da amostra por interações de pares iônicos com FE. As resinas utilizadas podem ser catiônicas (possuem carga negativa e retém íons positivos) (1) ou aniônicas (possuem carga positiva e retém

íons negativos) (2). Nesse caso, a seletividade e a retenção são muito dependentes do pH e da força iônica da FM (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).



A separação por exclusão é baseada na diferença de tamanho das moléculas, feita em uma coluna recheada com matéria inerte e porosidade definida (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007).

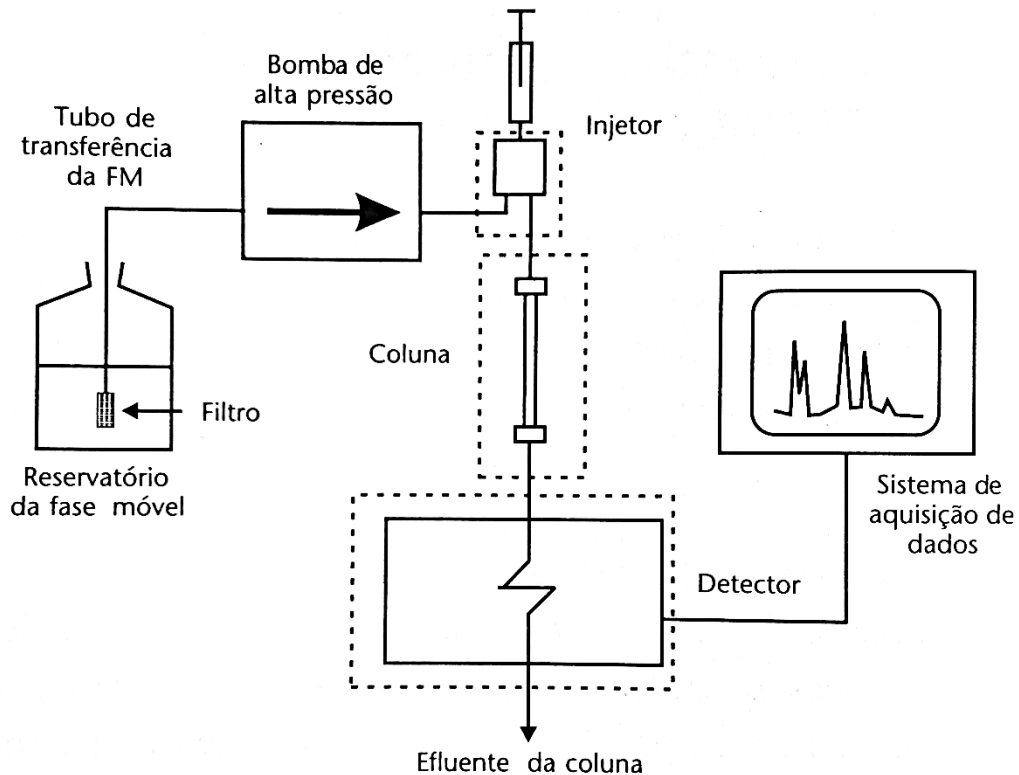
A cromatografia quiral vem sendo bastante utilizada, uma vez que ela permite a separação de misturas racêmicas, que são misturas compostas por enantiômeros (compostos que possuem um carbono quiral, mas as suas imagens especulares não são sobreponíveis). É uma técnica muito empregada pela indústria farmacêutica, pois permite definir a pureza ótica e a configuração estereoisomérica de fármacos, matérias-primas ou medicamentos, uma vez sabido que, quando há presença de um composto enantiomérico, um dos estereoisômeros pode apresentar alta atividade terapêutica e o outro uma alta toxicidade, a exemplo a talidomida (SINGH, A.; KEDOR-HACKMANN, E.; SANTORO, M., 2006).

3.2. Sistema cromatográfico

Existem diferentes modelos de cromatógrafos disponíveis no mercado, e justamente por isso, no momento da aquisição de um equipamento, características como a versatilidade, rapidez, reprodutividade e detectabilidade, devem ser levadas em consideração (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

O sistema cromatográfico da CLAE é composto por vários componentes, como mostrado na Figura 1:

Figura 1: Esquema de um cromatógrafo a líquido contendo: reservatório da FM; bomba que visa promover a passagem da FM pelo sistema com alta pressão; injetor para realizar a introdução da amostra; coluna cromatográfica; detector e o sistema para coletar os dados composto de um detector integrado a um software.



(Fonte: COLLINS, C.H; BRAGA G. L; BONATO P.S, 2006)

3.2.1. Reservatório da FM

O reservatório onde se coloca a FM, é, na maioria das vezes, feito de vidro, mas pode ser constituído de aço inoxidável ou plástico inerte, dependendo do tipo de análise a ser realizada. O tamanho é dependente da finalidade da análise. O nível do reservatório deve ser monitorado para que o volume seja adequado ao bombeamento evitando assim a falta de FM e a entrada de ar no sistema, pois isso pode ocasionar problemas mecânicos ao cromatógrafo (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

A FM deve ser previamente filtrada para que ao ser inserida no reservatório esteja livre de partículas, pois estas podem comprometer várias partes do sistema, como por exemplo, provocar o entupimento da coluna. Deve ser feita também a degaseificação da FM, principalmente quando esta for polar pois tende a dissolver

oxigênio e outro gases. A presença de bolhas pode levar a problemas no sistema de bombeamento e ou a geração de picos com a presença de interferentes. Essa degaseificação é feita principalmente através da ação de ultrassom, borbulhamento de gás hélio ou outro gás inerte e com baixa solubilidade (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010) (MEYER, V., 2004) (FIGUEIREDO, T., 2012).

3.2.2. Bombas de alta pressão

O sistema de bombeamento tem a função de pressurizar a FM do reservatório para dentro do cromatógrafo, a uma velocidade de fluxo constante e reprodutível. Elas são indispensáveis ao sistema cromatográfico, pois servem para vencer a alta pressão exercida pelo recheio da coluna, e se não fossem empregadas na CLAE, o tempo de análise seria demasiadamente longo. Adequadamente, uma bomba deve ter uma vazão contínua, uma faixa de pressão de 350 a 600 bar, ser inerte quimicamente a solventes comuns e deve resistir à variação da composição da FM (EUROPEAN, 2013) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (MEYER, V., 2004) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010).

Existem diferentes tipos de bombas, sendo elas: 1) pneumáticas, em que a pressão é exercida de forma constante por um gás inerte a alta pressão diretamente sobre o líquido ou em um recipiente que permita a compressão do líquido nele contido; 2) do tipo recíprocas, cujo movimento de vai-e-volta de pistões e por meio do sistema de válvulas libera volumes constantes de forma pulsátil; e 3) seringas, em que o êmbolo é deslocado de forma contínua e uniforme, comprimindo assim o líquido que está numa câmara, forçando sua passagem através de um orifício na própria câmara, determinando a vazão do sistema (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (ZANELLA, 2018) (HARVEY, D., 2000).

3.2.3. Programadores de FM, medidores e controladores de pressão

Em análises que se utiliza a eluição por gradiente, temos os chamados programadores de FM, que vão alterar a composição da fase durante o processo de separação. Existem dois tipos, os programadores 1) a alta pressão, onde diferentes reservatórios alimentam diferentes bombas, e elas liberam os solventes a uma alta pressão numa pequena câmara onde são misturados e segue para os demais

componentes do cromatógrafo; e 2) a baixa pressão, em que o gradiente é formado misturando-se os solventes em uma câmara a pressão atmosférica, e posteriormente essa mistura é bombeada por meio de uma única bomba de alta pressão para a coluna (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010) (FIGUEIREDO, T., 2012).

Os medidores e controladores de pressão basicamente tem a finalidade de monitorar e manter a pressão, e servem assim como uma ferramenta para otimização de método, aperfeiçoamento de separação, bem como para diagnosticar entupimentos ou vazamentos (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

3.2.4. Sistema injetor da amostra

Na CLAE, as amostras devem ser previamente solubilizadas na FM, para que, por meio do sistema injetor ela possa ser inserida na coluna. A adequada introdução da amostra na coluna de separação é um fator importante para que se tenha um bom desempenho da coluna, para tal, é preciso ter alguns cuidados para evitar entupimento do injetor, como a realização prévia da filtração da amostra, de modo a reter partículas sólidas e também a desgaseificação, para evitar bolhas de ar (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010).

O injetor pode ser manual, usando uma seringa apropriada. É a forma de introdução da amostra mais acessível e simples. Em geral, as seringas suportam uma pressão de aproximadamente 1500 psi. Outro tipo de injetor é o automático, para o qual existe um carrossel onde podem ser acomodados diversos frascos contendo as amostras, denominados *vials*, e assim são auto-injetados na coluna de forma consecutiva (FIGUEIREDO, T., 2012) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (SILVA, P., 2012) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010).

3.2.5. Coluna cromatográfica

Entre o injetor e a coluna, tem-se a coluna guarda, com objetivo principal de reter impurezas e impedir que estas danifiquem a coluna e assim aumentar a vida útil da coluna (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

As colunas analíticas usadas para a separação por CLAE geralmente são constituídas de aço inox, mas dependendo do tipo de amostra com que se trabalha, faz-se necessário o uso de colunas feitas de outros materiais, como por exemplo,

vidro, com o diferencial de que estas devem operar sob menor pressão. A FE que recheia a coluna cromatográfica é onde efetivamente ocorre a separação dos constituintes da amostra. A FE é composta por partículas pequenas, compactadas e distribuídas uniformemente ao longo da coluna cromatográfica (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (BRASIL, 2010) (MOLDOVEANU, S.; DAVID, V., 2017).

A eficiência de uma coluna cromatográfica é expressa pelo número de pratos teóricos, como será explicado posteriormente (LANÇAS, F., 2011). Elas podem apresentar comprimento variante entre 10 a 30 cm, com diâmetros internos de 1 a 5 mm, contendo no seu interior as partículas com diâmetros de 3 μ m a 10 μ m para colunas analíticas, apresentando assim cerca de 40.000 a 60.000 pratos m^{-1} . Hoje, é possível encontrar microcolunas, que possuem aproximadamente 100.000 pratos m^{-1} , fornecendo assim rapidez na análise e consumo reduzido dos solventes de alta pureza utilizados no sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F., 2005) (BRASIL,2010).

Existem as colunas preparativas, que são empregadas quando objetivo é separar e recuperar os analitos de uma amostra em uma quantidade suficiente para serem utilizados posteriormente em outros tipos de análise (SILVA, P., 2012).

3.2.6. Detector

Na CLAE, o detector tem a função de converter um sinal químico ou físico que seja mensurável para ser registrado, e geralmente esse sinal corresponde à concentração ou identificação do componente (SWARTZ, M., 2010).

Idealmente, os detectores em CLAE devem possuir o menor tamanho possível, para reduzir a emissão de ruídos e geração de possíveis interferentes que possam levar ao alargamento das bandas; serem capazes de suportar a vazão de líquido que chega até eles, ter alta sensibilidade e baixo limite de detecção, resposta rápida a todos os solutos, não sofrer variações às alterações de vazão da FM ou da temperatura, mas até hoje nenhum detector atende à todas características, existindo ainda limitações (SWARTZ, M., 2010) (KUMAR, S.; KUMAR, H., 2012).

Um detector pode ser universal, quando permite ser operado com diferentes analitos, ou seletivo, quando detecta somente uma classe ou tipo de substância. Podem ser classificados também como, destrutivos, como os espectrômetros de

massa, ou não destrutivos, como o ultravioleta–visível (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Os detectores por absorbância no ultravioleta (UV) e no visível (VIS) são amplamente utilizados devido ao fato de que muitos compostos, que são objetos de estudo absorvem nessa região. A concentração do analito é determinada pela Lei de Beer-Lambert (Equação 1):

Equação 1: Lei de Beer-Lambert

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

onde, A é absorbância, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz transmitida; ϵ é a absorbitividade molar ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$); b é o comprimento do caminho que a luz precisa atravessar na cuba onde esteja a amostra e a grandeza é dada em centímetros; c é a concentração molar do a ($\text{mol}^{-1}.\text{l}$) (SWARTZ, M., 2010).

O princípio de funcionamento é baseado na absorção de luz pela amostra, ao passar por uma radiação eletromagnética. Dentro dos detectores espectrofotométricos temos:

- Fotométrico que trabalha com um ou dois comprimentos de onda. A maioria deles operam em comprimentos de onda de 254nm e 280nm.
- O de comprimento de onda variável no UV-VIS, cuja faixa de 200 a 800 nm. É composto por uma fonte continua de emissão de radiação, por exemplo uma lâmpada de deutério ou tungstênio a alta pressão, cujo luz emitida passa por um monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado, gerando assim uma radiação monocromática que é projetada num divisor de feixe, e assim gera dois feixes por meio das lentes das celas da amostra e referência, levando às mudanças no estado energético das substâncias. Então, a diferença da quantidade de luz transmitida pelas celas chega até a fotomultiplicadora que gera um sinal. A vantagem desse tipo de detector é que ele permite o ajuste do comprimento de onda para que eles trabalhem num comprimento de onda que forneça maior seletividade ou que esteja na absorbância máxima de um analito.
- Arranjo de diodos, em que a radiação UV-VIS proveniente da fonte passa pela cela contendo a amostra, e a luz que emerge passa através de uma grade

holográfica, cujos comprimentos de onda resultantes são focalizados sobre os fotodiodos, que é rapidamente reproduzido no computador. Apresenta vantagens como a formação de espectros tridimensionais (absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção), pode-se obter e guardar o espectro de cada corrida, é possível definir a pureza do pico, e a subtração dos cromatogramas em dois comprimentos, permite a redução do desvio da linha de base e do ruído (SWARTZ, M., 2010) (BRASIL, 2010) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Hoje, utiliza-se detectores com espectrometria de massa, que permitem identificar os analitos que saem da coluna, por meio da medida da relação entre a massa molar e a carga gerada (m/z) após fragmentação do analito, propiciando assim uma alta seletividade. Outros tipos de detectores são: a) os de índice de refração, utilizado para amostras que não absorvem no UV-VIS e mede a diferença entre o índice de refração ótica da fase móvel pura e da fase móvel contendo a substância a ser analisada; b) potenciométricos ou eletroquímicos, utilizados para quantificar analitos que podem sofrer oxirredução em um eletrodo, sendo muito sensíveis e seletivos, mas necessitam de fases móveis isentas de oxigênios ou íons de metais redutíveis; c) fluorescência que detectam os grupos fluoróforos dos analitos ou que podem ser derivatizados e transformados em compostos fluorescentes; (SWARTZ, M., 2010) (SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F., 2005) (BRASIL, 2010) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

3.2.7. Sistema coletor de dados

O sistema coletor de dados, recebe as informações dos detectores, de modo a permitir que os dados sejam posteriormente manipulados e possam gerar os cromatogramas. Pode-se acoplar a esse sistema um microcomputador, que possibilita controlar a composição da fase móvel para as separações, a vazão da bomba, injeção da amostra, temperatura da coluna, entre outros parâmetros da CLAE (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (BRASIL, 2010).

3.3. Modos de eluição

Na CLAE a FM é o líquido que flui de maneira contínua através do sistema cromatográfico, arrastando consigo a amostra previamente solubilizada através da coluna, e esse processo é nomeado de eluição e pode ser de duas maneiras:

isocrática ou gradiente. A escolha da FM é de suma importância, tendo em vista que sua composição é fundamental para definir o processo de separação. Três critérios devem ser considerados durante a seleção da FM, sendo eles:

a) As características físico-químicas: os solventes utilizados devem ser grau cromatográfico ou ser de fácil purificação; devem ser capazes de dissolver a amostra sem promover a degradação da mesma; não devem decompor as FE; apresentar baixa viscosidade e ser compatível, tanto com o detector utilizado, quanto com misturas complexas.

b) A força cromatográfica, ou seja, a capacidade da FM selecionada em interagir com os anilto. Essa força é definida pela polaridade do solvente.

c) Seletividade, que está relacionada à solubilidade dos constituintes da amostra em solventes com polaridades semelhantes. (CHUST R.,1990) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006). A afinidade de uma substância pela fase estacionária é controlada pela polaridade da fase móvel (BRASIL,2010).

Na eluição isocrática, a força cromatográfica é constante, obtida por meio da utilização de um único solvente ou uma mistura de solventes cuja composição se mantém constante durante a análise, como por exemplo, uma CLAE – FR (cromatografia a líquida de alta eficiência de fase reversa) empregando como FM a mistura MeOH: H₂O: 80:20 (v/v) do começo ao fim da análise. Apresenta algumas vantagens, como a sua simplicidade, baixo custo e boa repetitividade (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

A eluição por gradiente é aquela em que são utilizados dois ou mais sistemas de solventes com diferenças de polaridade durante a separação e assim observa-se um aumento gradativo na força cromatográfica por meio da elevação da porcentagem de solvente orgânico. Tipicamente, esse tipo de eluição se inicia com uma faixa isocrática pequena, onde a FM mais fraca passa pela coluna, e é após essa etapa que se inicia, de fato, o gradiente. (GLÖCKNER, G., 1987). Este tipo de eluição melhora a eficiência da separação, pois são obtidos picos mais simétricos e com melhor resolução, porém apresenta algumas restrições, como o fato de não alguns tipos de cromatografia, a exemplo a cromatografia líquido-líquido. É importante ressaltar que, apesar de algumas desvantagens, existem casos em que a utilização da eluição por gradiente se faz necessária, por exemplo quando a amostra é composta por uma mistura complexa de substâncias com propriedades químicas variadas e com tempos de retenção não muitos distintos; quando a amostra possui

moléculas grandes ou quando a amostra tem uma grande quantidade de interferente (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F., 2005).

A escolha do modo isocrático ou gradiente basicamente depende da quantidade de componentes a serem eluídos e separados. Para auxiliar nessa escolha, uma separação com eluição gradiente pode ser efetuada, e posteriormente se faz a razão entre o tempo total de corrida (t_{total}) e a diferença do tempo de eluição entre o primeiro e o último componente (t_2-t_1). Se o resultado dessa razão ($t_{total} / (t_2-t_1)$) for $< 0,25$, a eluição isocrática é mais adequada, e se for $> 0,25$ a eluição gradiente é preferível (SHAH, B. et al., 2012).

3.4. Cromatografia em fase reversa e fase normal

A natureza dos grupos que constituem as FE contidas nas colunas cromatográficas pode variar, podendo elas serem polares, configurando assim a chamada fase normal (FN), ou podem ser apolares, e são assim denominadas fase reversa (FR), e isso define o tipo de interação química da superfície com o eluente. A escolha da FE depende da solubilidade dos analitos da amostra na FM, uma vez que eles devem ser solúveis na FM escolhida (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (RAMOS, R., 2014).

3.4.1. CLAE – FN

Em sistemas de fase normal, geralmente a FE polar é composta por um suporte de sílica (SiO_2) ou alumina (Al_2O_3), com a superfície coberta por grupos: hidroxilas (-OH), grupos cianos (-CN), amino (NH_2) ou a própria sílica, que conferem a essas superfícies alta polaridade. Pode-se utilizar também a sílica modificada com trimetoxi glicidoxipropil silanos, que diminui a polaridade da superfície, e seu uso, associado aos modificadores de eluição de fase, aumentam a reprodutibilidade e a robustez da separação (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

A FM utilizada no modo normal é constituída por um solvente de baixa polaridade, como por exemplo o hexano, podendo conter uma pequena quantidade de um modificador de polaridade (ex.: metanol) para permitir o controle da retenção do analito na coluna (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007).

A separação baseia-se na diferença de força das interações polares dos analitos com a fase estacionária, sendo um processo competitivo, pois as moléculas

da amostra competem com a FM pelos locais de adsorção na superfície da fase estacionária (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007).

3.4.2. CLAE – FR

A CLAE-FR, provavelmente, é o procedimento analítico mais universal e sensível. Seu amplo emprego se dá pelo fato da sua alta aplicabilidade, haja vista que com ela é possível lidar com amostras complexas por causa da capacidade de diferenciar compostos estreitamente semelhantes, ou seja, compostos que possuem estruturas, peso molecular ou grupos químicos semelhantes (relacionados a baixa energia de fundo que permite discriminar diferenças pequenas nas interações moleculares desses analitos). Além disso, essas fases reversas permitem a utilização mais fácil de eluição por gradiente e alta reprodutibilidade (BORGES, E.; GORAIEB, K.; COLLINS, C., 2012) (KUMAR, S.; KUMAR D., 2012) (CHUST, R.,1990) (MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I., 2010).

Nesse tipo de sistema, a separação envolve principalmente forças dispersivas (interações de Van de Waals). A FM é constituída por solventes polares, como água, metanol, acetonitrila. O solvente orgânico (modificador) pode ser adicionado para diminuir a polaridade da fase móvel aquosa (KUMAR, S.; KUMAR, H., 2012).

As FE empregadas consistem de uma camada orgânica apolar ligada quimicamente, imobilizada ou sorvida a um suporte cromatográfico, que forma superfícies porosas e hidrofóbicas. O suporte mais empregado é a sílica (SiO_2), por esta apresentar um padrão de partículas porosas esféricas com precisão e coerência na distribuição de tamanho e poros, porém ela é solúvel em pH alto, embora a sua ligação com grupos alquísilanos possa aumentar sua faixa de estabilidade para 10. Uma alternativa apresentada à sílica, é a zircônia, que é estável em uma ampla faixa de pH (1 – 14), mas tem uma baixa capacidade para ligar diferentes grupos à sua superfície (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007).

Grande parte das FE são preparadas pela reação de silanos, por exemplo, $\text{XSi}(\text{R}_1)_2\text{R}_2$, onde X representa um cloro ou alcóxido, os grupos R1 são grupos hidrofóbicos com cadeia alquílica (como, metil, etil e propil) e o grupo R2 é uma cadeia alquílica extensa, como 8 ou 18 carbonos. Quanto maior a cadeia de hidrocarbonetos, maior é o fator de retenção (BORGES, E.; GORAIEB, K.; COLLINS, C., 2012).

Hoje existem fases monoméricas que são estericamente protegidas, em que

grupos volumosos, como isopropil (C_3H_7), são colocados, e impedem que os silanóis residuais ataquem a FE, e assim garantem maior estabilidade das mesmas quando comparadas com as fases convencionais (BORGES, E.; GORAIEB, K.; COLLINS, C., 2012) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Alguns fatores podem afetar a separação utilizando FR, dentre eles cita-se:

- pH, pois ele controla as propriedades de eluição e de ionização. Na CLAE-FR, o pH utilizado está geralmente entre 2 - 8, porque em análises cujo analito é básico, pode ocorrer reação de grupos hidroxilas com grupos silanóis indesejáveis, levando à degradação da FE e conseqüentemente alargamento frontal do pico.
- Viscosidade: não somente para a FR, mas também para a FN, quanto menor a viscosidade, menor será o tempo de análise. O recomendado é que a viscosidade seja menor que 0,5 centipoise.
- Temperatura: ela tem efeito principalmente em solutos com baixa massa molecular, pois uma vez aumentada a temperatura da coluna, há uma redução na viscosidade da FM utilizada, levando a uma transferência de massa mais eficiente, e conseqüentemente a uma resolução mais elevada (BORGES, E., GORAIEB, K., COLLINS, C., 2012) (LANÇAS, F., 2012).

Como alternativa às ligações químicas, nos últimos anos tem sido empregado fases com suportes óxidos recobertos com polímeros. A grande vantagem desse tipo de fase é que há possibilidade de um maior recobrimento do suporte e confere uma maior seletividade. Dentre os polímeros temos, o polietileno, poliestireno, entre outros (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

3.5. Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

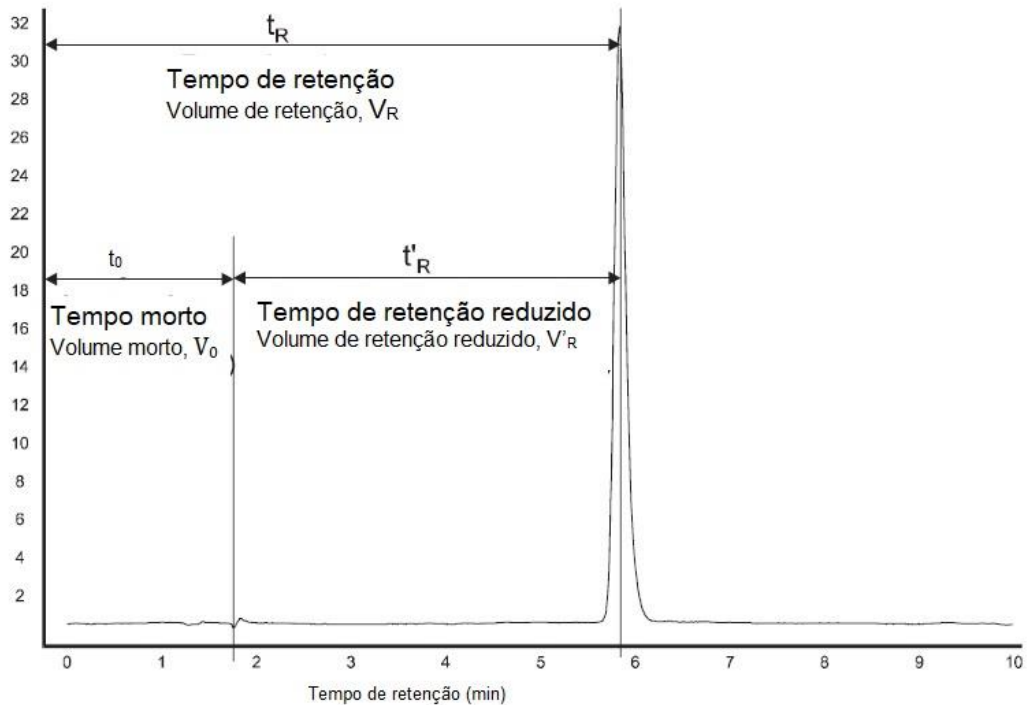
Para se obter uma separação apropriada de compostos de uma amostra utilizando CLAE é necessário compreender alguns parâmetros que podem variar e as condições experimentais que podem afetar a análise, de modo a promover uma adequação do sistema ao tipo de separação que será realizada.

3.5.1. Tempo de retenção (t_R) e fator de retenção (k).

O tempo de retenção (Figura 2) é o tempo desde a injeção da amostra até a aparição do pico no cromatograma, sendo este característico da substância analisada, porém não é exclusivo, sendo insuficiente para realizar a total

caracterização da amostra (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.2010).

Figura 2: Descritores de retenção do analito



(Fonte: SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010)

O tempo de retenção reduzido (t'_R), é calculado pela diferença entre o tempo de retenção total (t_R), que é o tempo necessário para eluir uma substância, e o tempo morto (t_0), que é o tempo necessário para eluição de componentes que não interagem com a FE, e é demonstrado a seguir (Equação 2):

Equação 2: Fórmula para cálculo do tempo de retenção

$$t'_R = t_R - t_M$$

O volume de retenção (Figura 2), é o volume de FM que é necessário para eluir a substância. Analogamente, o volume de retenção reduzido (V'_R) (Equação 3), corresponde à diferença entre o volume de retenção do analito (V_R), que é o volume de FM necessário para eluir uma substância por um sistema cromatográfico, e o volume morto (V_0) que é o volume de FM necessário para preencher todos os

interstícios e poros da FE, ou o volume necessário para eluir algum composto que não estabeleça nenhuma interação com a FE, representado pela :

Equação 3: Fórmula para o cálculo do volume de retenção reduzido

$$V'_R = V_R - V_0$$

Como o tempo de retenção absoluto pode variar entre equipamentos ou pelo uso de solventes e reagentes diferentes, utiliza-se o fator de retenção, k uma grandeza adimensional, que é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela FE e a quantidade com afinidade pela FM, e é independente das dimensões da coluna utilizada e do fluxo da fase móvel empregada. O k pode ser definido pela Equação 4:

Equação 4: Fórmula para o cálculo do fator de retenção

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

A quantidade de soluto em cada fase é igual a concentração vezes o volume de cada fase (equação 5). O processo de retenção cromatográfica é baseado no equilíbrio da distribuição do analito entre as FM e FE, desse modo, a constante de equilíbrio (K) é proporcional ao fator de retenção (k), como representado pela Equação 5:

Equação 5: Fórmula para o cálculo do equilíbrio da distribuição do analito entre as FM e FE

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s / C_m}{V_s / V_m}$$

$$= K \Psi$$

$$K = (C_s / C_m)$$

$$\Psi = (V_s / V_m)$$

onde K é a constante de equilíbrio, C_s e C_m são a concentração de soluto na FE e FM, respectivamente, Ψ , é a proporção de volumes de fases estacionárias e de fase móvel dentro da coluna, V_s e V_m são os volumes da FE e FM respectivamente.

Na cromatografia a líquido, o analito compete com o eluente pelo sítio de ligação na fase estacionária, e assim, a energia resultante responsável pela retenção do analito é a diferença entre a interação do analito com a FE e a interação do eluente com a fase estacionária (dependente da composição do eluente).

É possível observar que quanto maior k , maior a afinidade do analito pela FE, logo, maior o tempo de retenção. O fator de retenção é uma propriedade muito importante de cada pico no cromatograma, pois ele auxilia na interpretação e no aprimoramento de uma separação (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.2010).

3.5.2. Seletividade (α)

A seletividade (α) está relacionada com a capacidade do sistema cromatográfico de discriminar entre diferentes analitos. É determinada pela razão entre fatores de retenção de dois analitos (k) ou a proporção dos tempos de retenção reduzidos (t_{R0} , t_{R1} , t_{R2}), como representado pela equação 6:

Equação 6: Fórmula para o cálculo da seletividade

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

O aumento da seletividade durante o processo de separação de uma amostra complexa é o principal objetivo de qualquer cromatógrafo, porque se a seletividade para um par de analitos for igual a 1, então não importa o quão estreito são os picos ou a rapidez que ocorre a separação, não é possível realizar a separação dos componentes da amostra. O ideal é que a seletividade fique entre 1 e 10. Esse parâmetro é bastante dependente da natureza das amostras e da interação de cada componente com a FE. É pouco afetado pela composição da FM ou temperatura, a menos que estes últimos alterem a natureza da amostra (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

3.5.3. Eficiência (N)

Quando a amostra é introduzida na coluna cromatográfica, é formada uma pequena zona cromatográfica onde os analitos se distribuem de maneira uniforme, e durante o tempo que essa zona está passando pela coluna, ela vai sendo ampliada. O grau de alargamento dessa banda ou de dispersão do pico, que aparece no cromatograma é denominado eficiência e pode ser considerada uma propriedade da coluna. É afetada principalmente pela geometria e uniformidade das partículas que preenchem (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R.,2007) (AHUJA, S.; RASMUSSEM, H.,2007).

Em 1941, Martin e Synge, introduziram o número de pratos teóricos, N, que representa a eficiência de uma coluna cromatográfica, pois quanto maior N, maior o número de estágios de equilíbrio entre a FE e a FM, promovendo assim uma separação mais eficiente. Esse valor é influenciado pelo tipo de amostra, composição das fases, temperatura, partículas constituintes da coluna e comprimento coluna cromatográfica (BRASIL,2010) (CHUST.R., 1990) (MARTIN, A.; SYNGE, R., 1941).

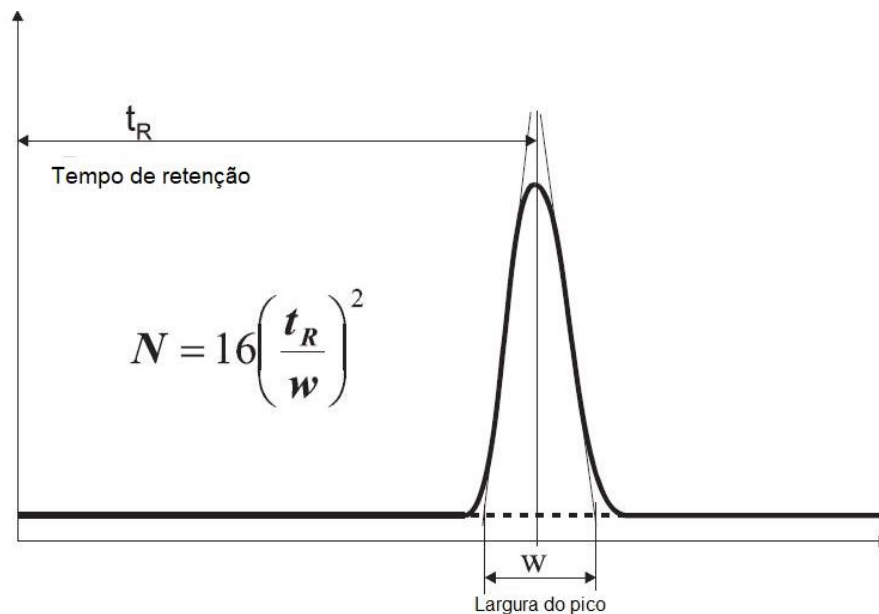
O número de pratos teóricos para picos com forma gaussiana, pode ser calculado pelas equações 7, seguintes:

Equações 7: Fórmulas para o cálculo da eficiência

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \qquad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2$$

onde t_R é o tempo de retenção do analito, w é a largura do pico na base medida em unidades de tempo, e $w_{h/2}$ é a largura do pico à metade da altura, como mostrado na Figura 3:

Figura 3: Medições de eficiência (número de pratos teóricos na coluna)



Fonte: SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010)

É recomendado que não se injete um volume de amostra maior do que 1% do volume da coluna vazia, pois desta forma, é possível aproveitar todos os pratos teóricos que a coluna possui. Como existem diferentes tipos e tamanhos de colunas, a equação 8, nos mostra qual o volume máximo que deve ser injetado em cada coluna:

Equação 8: Fórmula para o cálculo do volume máximo de injeção na coluna

$$V_{\text{máximo}} = \pi \times r^2 \times L \times 0,01$$

onde, $V_{\text{máximo}}$ é o volume máximo de injeção em μL , r é o raio da coluna em milímetros, o L é o comprimento da coluna em milímetros e 0,01 refere-se ao máximo de 1% que pode ser injetado da amostra.

A seletividade e eficiência são parâmetros cromatográficos complementares, e eles podem ser otimizados de modo a obter uma separação adequada. A eficiência é uma propriedade mais relacionada a coluna, enquanto que a seletividade está relacionada à natureza dos analitos e a composição da fase estacionária (KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R., 2007).

3.5.4. Resolução (R_s)

A resolução, R_s , consiste na razão entre a distância entre os dois picos e a largura média desse pico (medido na linha base). Esse parâmetro que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, ou seja, o grau em que um pico se distingue do outro no cromatograma. A área ou altura do pico, em geral, são proporcionais à quantidade de substância que foi eluída através do sistema (BRASIL, 2010) (CHUST.R., 1990). Ela pode ser definida pela Equação 9:

Equação 9: Fórmulas para o cálculo da resolução

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 - W_2} \qquad R_s = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{W_{1,h/2} - W_{2,h/2}}$$

em que, t_2 e t_1 são os tempos de retenção das duas substâncias da mistura; W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, $W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura, ou seja, é basicamente a razão entre a (diferença nos tempos de retenção) / (largura média do pico) (SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J., 2010).

3.5.5. Fator de cauda (T) e fator de assimetria (A_s)

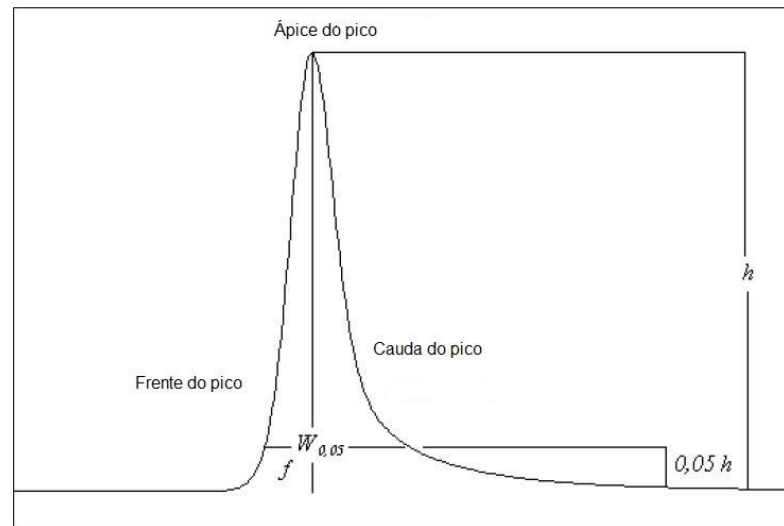
Outro fator importante para adequabilidade do sistema cromatográfico, é o fator de cauda, representando por T , que indica a simetria do pico. Se obtivemos $T=1$, o pico é perfeitamente simétrico, e quanto maior for esse valor, mais assimétrico é o pico, tornando a precisão e integração menos fidedignos. Esse fator é calculado pela Equação 10: (BRASIL, 2010)

Equação 10: Fórmula para o cálculo do fator de cauda

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

onde, $W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura e f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura, como pode ser visto na Figura 4:

Figura 4: Cromatograma representando assimetria do pico



(Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição)

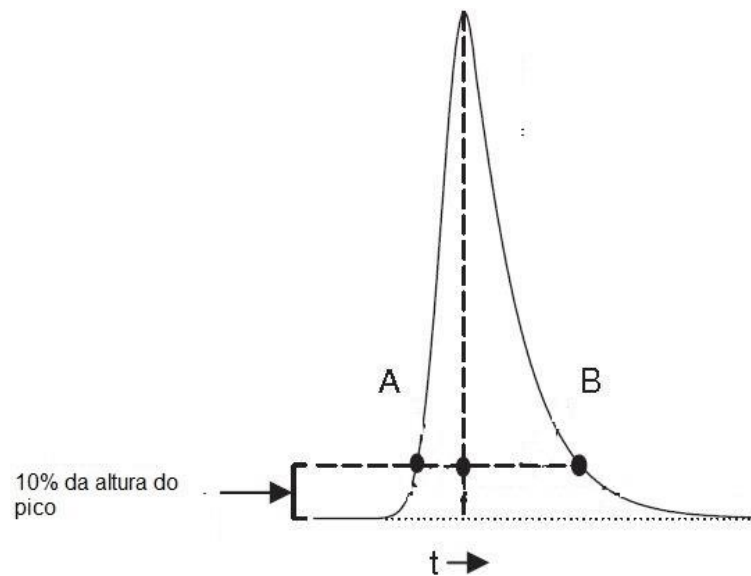
Outra forma de se medir a simetria dos picos é através do fator de simetria (A_s), que pode ser calculada a 10 ou a 5% da altura do pico, sendo que no trabalho está representando o cálculo utilizando a 10% da altura do pico. Ele pode ser calculado pela Equação 11:

Equação 11: Fórmula para o cálculo da assimetria de pico

$$A_s = \frac{B}{A}$$

onde A descreve a distância da frente do pico ao máximo, e o B refere-se a distância do máximo ao final do pico (Figura 5). Os picos são simétricos quando essa razão resulta em 1, mas na realidade, o desejável é que esse resultado seja menor do que 1,5 (MEYER, V., 2004).

Figura 5 adaptada: Definições de assimetria de pico



(Fonte: SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.2010).

3.6. Aplicações

A CLAE é uma técnica de separação que, devido sua versatilidade e abrangência, se tornou um dos métodos analíticos mais empregados, tanto para análises quantitativas quanto para análises qualitativas (TONHI, E., et al.,2002). A análise cromatográfica por CLAE apresenta diferentes parâmetros variáveis, e estes necessitam ser adequados às condições do laboratório em que será feita a análise e controlados, para que se obtenha as separações de interesse (SAHU, 2017).

Existem inúmeros artigos sobre quantificação de fármacos por CLAE, como por exemplo o artigo de Lavra Z., et al., publicado em 2008, em que, desenvolveram e validaram um método, de aplicação na rotina dos laboratórios, para a determinação simultânea de 3 anti-retrovirais presentes em uma combinação de dose fixa e que era composta por lamivudina, zidovudina e nevirapina. Durante o desenvolvimento foram testados 5 métodos para quantificação dos fármacos, e baseados nos parâmetros: resolução, fator de capacidade, fator de assimetria e número de pratos teóricos, determinaram o método mais adequado para a rotina e que apresentou melhor resolução e tempos de retenção (LAVRA, Z., et al, 2008).

Face à importância e à complexidade da CLAE, torna-se importante compreender o funcionamento básico do sistema de separação e estabelecer quais

parâmetros podem ser variados durante o desenvolvimento e otimização de um método, principalmente para a quantificação de fármacos.

4. MÉTODO

4.1. Parâmetros utilizados para quantificação de fármacos por CLAE.

Foi realizada uma busca bibliográfica nas principais bases de dados Pubmed, Science Direct, Scopus, Web of Science e Periódicos Capes, sobre quais são e como estabelecer os parâmetros e as condições que são necessários para desenvolver um método analítico cromatográfico para quantificação de fármacos. As buscas foram divididas em quatro tópicos: 1) FE utilizada na análise, partindo-se da disponibilidade do laboratório e das características de polaridade do analito; 2) composição da fase móvel (FM); 3) modo de eluição do processo isocrático ou gradiente 4) os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico; utilizando as palavras-chaves: HPLC, Method, Review, System, Chromatography. Foram realizadas buscas de artigos do período entre 2008 e 2018, que trouxessem desenvolvimento e otimização de método por CLAE para quantificação de fármacos isolados ou contidos em diferentes formas farmacêuticas, e que não utilizassem tratamento quimiométrico. Os artigos foram selecionados primeiramente empregando combinações de palavras-chave, como: HPLC and REVIEW, HPLC and SYSTEM, HPLC and CHROMATOGRAPY. Posteriormente refinou-se a seleção por artigos contendo no título indicativo de aplicação para quantificação de fármacos por CLAE.

4.2. Desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE

Foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados Pubmed®, Science Direct, Scopus, Web of Science e Periódicos Capes, sobre o processo de desenvolvimento e otimização de métodos para quantificação de fármacos por CLAE, utilizando as palavras-chaves: HPLC, Method, Review, Optimization, Development. Foram selecionados artigos, do período entre 2008 e 2018, que trouxessem detalhamento das etapas empregadas no desenvolvimento e otimização de método por CLAE para quantificação de fármacos isolados ou contidos em diferentes formas farmacêuticas, e que não utilizassem tratamento quimiométrico. Os artigos foram selecionados primeiramente empregando combinações de

palavras-chave, como: HPLC and METHOD, HPLC and METHOD and DEVELOPMENT, HPLC and OPTIMIZATION and REVIEW. Os artigos foram selecionados primeiramente pelo título indicativo de procedimento para quantificação de fármacos por CLAE. Esta pesquisa bibliográfica visou selecionar artigos que demonstraram as etapas que diferentes autores utilizaram durante o desenvolvimento e otimização de método analítico. Por meio da avaliação dos diferentes procedimentos houve a proposição de um fluxograma para as etapas de desenvolvimento analítico.

4.3. Fluxograma sobre as etapas para desenvolvimento e otimização dos métodos por CLAE para quantificação de fármacos.

Baseado nas informações obtidas elaborou-se um fluxograma com os procedimentos básicos para se desenvolver e otimizar métodos para quantificação de fármacos por CLAE. Partindo-se das condições de laboratório e das características físico-químicas do analito previamente conhecidas, faz-se a proposição da fase estacionária. Em seguida são elencados os possíveis constituintes para a fase móvel, em paralelo são avaliadas diferentes proporções dos constituintes, sempre discutidas em paralelo a avaliação dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico. Cada etapa irá gerar um nível, proporcionando assim a construção de um fluxograma para o desenvolvimento do método.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros existentes utilizados para desenvolver um método cromatográfico para quantificação de fármacos

5.1.1. FE que será utilizada na análise

As fases estacionárias mais amplamente utilizadas são aquelas em que grupos funcionais, polares ou apolares, estão quimicamente ligados a um suporte, na maioria das vezes sílica, podendo atuar no modo normal, reverso ou ambos (DEGANI, A., CASS, Q; VIEIRA, P.,1998). Quando as colunas contêm uma FE constituída de sílica-gel derivatizada (sílica hidreto ou tipo C), elas podem ser usadas tanto no modo normal quanto no reverso, e permite que sejam utilizadas diferentes composições de FM e solventes orgânicos e aquosos (ZOCOLO, G., 2012).

Além dessas, existem as FE de modo misto, que possuem capacidade para trabalhar com múltiplos modos de separação: FN, FR e troca iônica, e o grande diferencial dessas FE é que a força das interações e/ou a seletividade podem ser ajustadas por meio de ativação ou desativação de grupos presentes na coluna, alterando parâmetros como: pH, utilização de modificadores orgânicos, concentração de tampão ou temperatura (MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I., 2010).

A escolha da coluna deve ser baseada nas propriedades físico-químicas do fármaco que será quantificado, e o mais indicado é que a FE tenha polaridade semelhante à amostra e uma FM com polaridade distinta. A utilização de FE com composição diferente da amostra pode ocasionar tempo de retenção curto, porém se esta tiver polaridade idêntica à do analito, o tempo de retenção pode ser demasiadamente longo (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006) (BRASIL, 2010) (MOLDOVEANU, S.; DAVID, V., 2017).

Na tabela 1 estão presentes algumas fases estacionárias, os mecanismos de separação e sua utilização:

Tabela 1: Características de FE sólida empregada em separação pelo mecanismos de partição e adsorção

FE	Mecanismos de separação	Estrutura da FE	Utilização
FE quimicamente ligadas, obtidas pela reação dos grupos silanóis da sílica com compostos contendo grupos polares ou apolares	Partição e adsorção	FN os grupos funcionais são polares e os mais comuns são: diol, ciano, amino	Separação de variadas substâncias orgânicas solúveis nos solventes usados em FN ou que são instáveis em soluções aquosas
		FR os grupos funcionais são apolares e os mais comuns são: butil, octadecil, octil, fenil.	Aplicação quase que universal, pois permite análise de substâncias hidrossolúveis e/ou iônicas, substâncias lipofílicas e a separação de misturas complexas

As FE quimicamente ligadas, funcionam principalmente, pelo mecanismo de partição, mas como essa FE apresenta influência de grupos ativos da própria fase ou do suporte, também acontece o mecanismo de adsorção (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

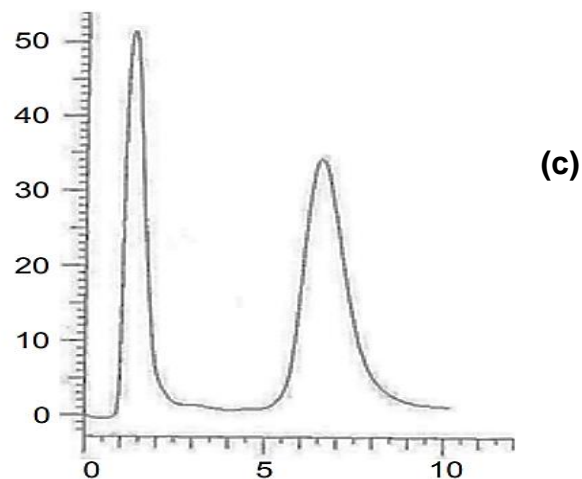
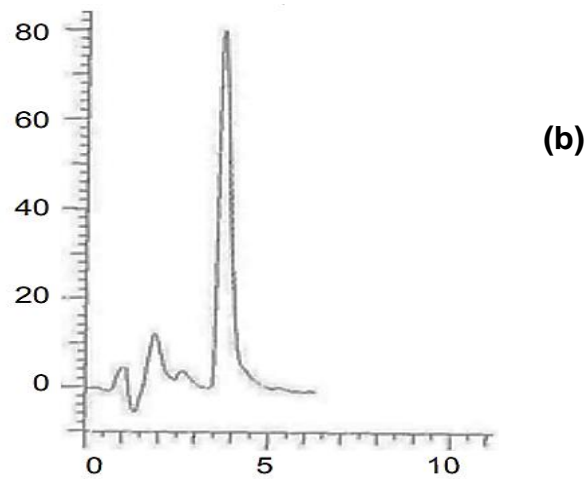
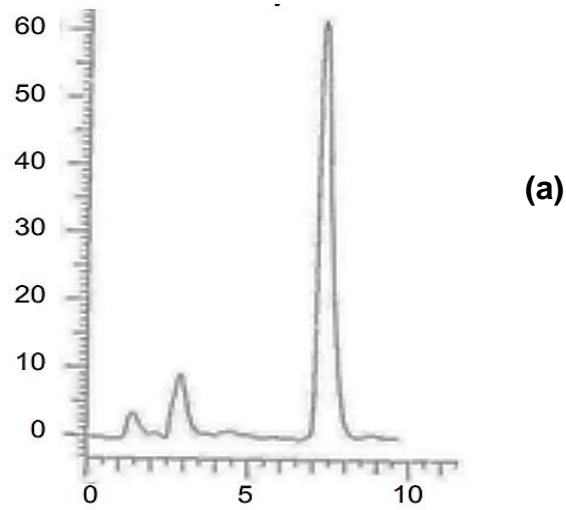
Existem variados tipos de colunas cromatográficas, constituídas de diferentes tipos recheios, comprimentos, diâmetros internos. Um fator crítico e que deve ser considerado é o tamanho e padrão da partícula que compõe a FE, pois eles controlam o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Se as partículas forem muito pequenas podem gerar alta resistência ao fluxo da FM necessitando-se aplicar uma pressão maior, e em contrapartida, partículas grandes são responsáveis por um alargamento da banda (SNYDER, L., KIRKLAND, J., DOLAN, J.2010) (MEYER, V., 2004) (LANÇAS, F.,2011). Luo e colaboradores (2018), desenvolveram um método cromatográfico para a determinação quantitativa de succinato de trelagliptina e substâncias relacionadas contidas em comprimidos, e para a otimização das condições cromatográficas, um dos fatores variados foi a coluna e foi selecionada aquela em que se obtinha a melhor resolução. Todas as colunas eram C18, mas diferiam entre

si no tamanho das partículas do empacotamento, tamanho dos poros, comprimento da coluna (LUO, Z., *et al.*, 2018).

Henriques e colaboradores (2017), desenvolveram e validaram um método por CLAE indicativo de estabilidade para a lactona sesquiterpênica isolada da *Lychnophora trichocarpha* (arnica brasileira). Empregaram diferentes condições cromatográficas, dentre elas, variaram a composição da FE, utilizando duas colunas com mesmo preenchimento de octadecilsilano (C18), mas com diferentes tamanhos de partículas, sendo uma com 5 μm (coluna 1) e outra com 3 μm (coluna 2). Com base nos cromatogramas resultantes, viram que, a coluna 2, com partículas de menor tamanho, apresentou melhor separação e resolução dos picos. Esse resultado se deve ao modo de preparo dessa coluna, pois há uma manipulação da morfologia das partículas por meio da reação controlada dos grupamentos C18 com partículas de sílica contendo grupo silano trifuncional, e a modificação da superfície, por meio da aplicação de uma nova tecnologia de cobertura (capeamento que diminui o número de grupos silanóis livres), e assim, esses aperfeiçoamentos da FE conduziram à melhor resolução dos sinais cromatográficos e a menor tempo total de análise (HENRIQUES, B., *et al.*, 2017)

Durante o desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico, uma possibilidade é alterar a fase estacionária, porém este é um fator limitante, pois na maioria das vezes dependerá da disponibilidade de colunas do laboratório onde serão feitos os procedimentos analíticos. Ghari, Kobarfardb, Mortazavi (2013), realizaram um estudo para desenvolver um método por CLAE para a análise de azitromicina isolada e contida em diferentes FF, e para tal, empregaram 4 tipos de coluna de fase reversa, dentre as quais variavam: o número de carbonos (C8 ou C18), o comprimento da coluna (250, 100 e 150 mm), o diâmetro das partículas do empacotamento (3, 5 e 10 μm). Com base na largura e simetria dos picos obtidos, observaram que os melhores resultados foram obtidos quando se emprega uma coluna C18, 5 μm , 250 mm \times 4,6 mm (Figura 6a). Quando se diminuía o comprimento da coluna, apesar do menor tempo de retenção, ocorria aumento da assimetria dos picos. Diminuindo o tamanho das partículas de 5 μm para 3 μm (Figura 6b), observou-se também uma acentuada assimetria dos picos, e quando se aumentou o tamanho para 10 μm os picos fornecidos eram perfeitamente simétricos, porém houve aumento na largura do pico (Figura 6c) (GHARI, T.; KOBARFARDB, F.; MORTAZAVIA, S., 2013).

Figura 6: Cromatogramas da azitromicina usando: (a) coluna MZ-Analysentechnik GmbH, coluna Perfectsil alvo, ODS-3 (250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partícula); (b) coluna ODS-H ótimo, Capital, (150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 3 μm de tamanho de partícula); (c) coluna Lichrospher RP-18, Merck (250 mm comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 10 μm de tamanho de partícula)



De acordo com a sua composição a FE pode ser classificada como: normal ou reversa. A fase reversa é a mais difundida e aplicada, podendo ser útil desde o desenvolvimento de produtos inovadores até as análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade. Este modo analítico pode ser empregado para separação de constituintes de uma matriz ou mistura, nos testes de identificação do analito e também para a quantificação (MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I., 2010). Alhazmi e colaboradores (2018), desenvolveram um método por CLAE de fase reversa para determinação simultânea de quatro fármacos, indicado para o tratamento de distúrbios cardiovasculares, contidos na forma farmacêutica de comprimidos. Para tal, foram analisados os fármacos em amostras do granel e do produto final. Para a análise, utilizaram uma coluna C18 e variaram a composição da fase móvel, sendo a FM constituída por tampão acetato de amônio e acetonitrila (40:60) a que forneceu melhores resultados (ALHAZMI, H., *et al.*, 2018).

A CLAE-FR apresenta significativas vantagens comparada com a CLAE-FN, por isso sua aplicabilidade é mais significativa e universal. Dentre os pontos positivos destacam-se a menor resistência à passagem da FM, o fato de colunas para utilização no modo reverso serem mais resistentes à variação de pH proporcionada pela FM, apresentarem maior seletividade e possibilitar o uso e maior diversidade de solventes (TONHI, E., *et al.*, 2002).

5.1.2. Composição da fase móvel (FM)

A composição da FM é de suma importância para o processo de separação cromatográfica. Os solventes empregados em CLAE devem apresentar algumas características, tais como:

- 1) Alto grau de pureza, sendo assim denominados “solventes grau cromatográfico”, pois isso possibilita que sejam analisadas amostras em baixas concentrações e reduz possíveis interferências advindas de impurezas.
- 2) Dissolver a amostra sem degradá-la; quando possível é indicado que o solvente usado na FM seja o mesmo utilizado no preparo das soluções.
- 3) Baixa viscosidade, pois se for muito viscoso haverá necessidade de se aplicar uma pressão muito maior para que o solvente flua através do sistema e isso influencia a transferência de massa do soluto entre FM e a FE. Normalmente

são usados solventes com faixa de viscosidade de 0,4 a 0,5 mPa.s, ou pode-se aumentar a temperatura durante a análise para reduzir viscosidade do solvente.

- 4) Ter compatibilidade com o detector que está sendo empregado, como exemplo de compatibilidade para detector ultravioleta a FM não pode absorver no comprimento de onda selecionado para análise (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Outro aspecto a considerar para selecionar a FM é a força cromatográfica, que mede a capacidade da FM de interagir com os constituintes da amostra, e é determinada pela polaridade dos solventes. É um parâmetro importante, pois a retenção dos analitos é controlada por essa força dos solventes, uma vez que solventes fracos possuem uma polaridade distinta da FE, logo, essa FM não irá competir com o analito pelos sítios de ligação da FE, sendo assim ocorre aumento da retenção do analito, e com os solventes fortes (polaridade semelhante à FE) esta retenção diminui. A seleção dos solventes é baseada no fator de retenção (k), uma vez que esse fator k é baixo, significa que há pouca interação dos solutos com FE, podendo levar a uma análise ineficiente, e um fator k elevado, apresenta a grande interação dos solutos com FE acaba resultando em tempos longos de análise e alargamento de pico. Em geral, a força cromatográfica ótima é obtida por tentativa e erro, em que a composição da FM vai sendo alterada a cada análise até se obter os resultados pretendidos (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

A escolha da composição da fase móvel é um dos passos quando se busca desenvolver ou otimizar um método cromatográfico. Lavra e colaboradores (2008), desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea de 3 antirretrovirais em comprimidos de dose-fixa, utilizados no tratamento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Durante a pesquisa, eles variaram alguns parâmetros, dentre eles a proporção de tampão que constituía a FM. Eles testaram diferentes composições de acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico pH 3, como mostrado na tabela 2, e analisaram qual seria a melhor condição cromatográfica baseados em parâmetros como tempo de retenção e nos cromatogramas obtidos.

Tabela 2: Resultado dos testes realizados durante o desenvolvimento do método analítico proposto para quantificação de 3TC, AZT e NVP

Parâmetros	Método					
	1	2	3	4	5	6
FM	60:40	60:40	25:75	75:25	60:40	60:40
FE	C8	C18	C18	C18	C18	C18
Fluxo (mL/min)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5
3ATC	2,4	2,4	2,4	2,8	2,3	1,6
T _R (min)	AZT 3,4	3,4	2,7	5,0	2,9	1,9
	NVP 4,6	4,8	3,1	10,1	3,4	2,3
Volume de injeção (µL)	20	20	20	20	10	20
Resultado	Picos com assimetria caudal	Boa resolução entre picos e áreas reprodutíveis	Não houve separação dos picos	TR alto para rotina de análise	Áreas não reprodutíveis	Picos muito próximos

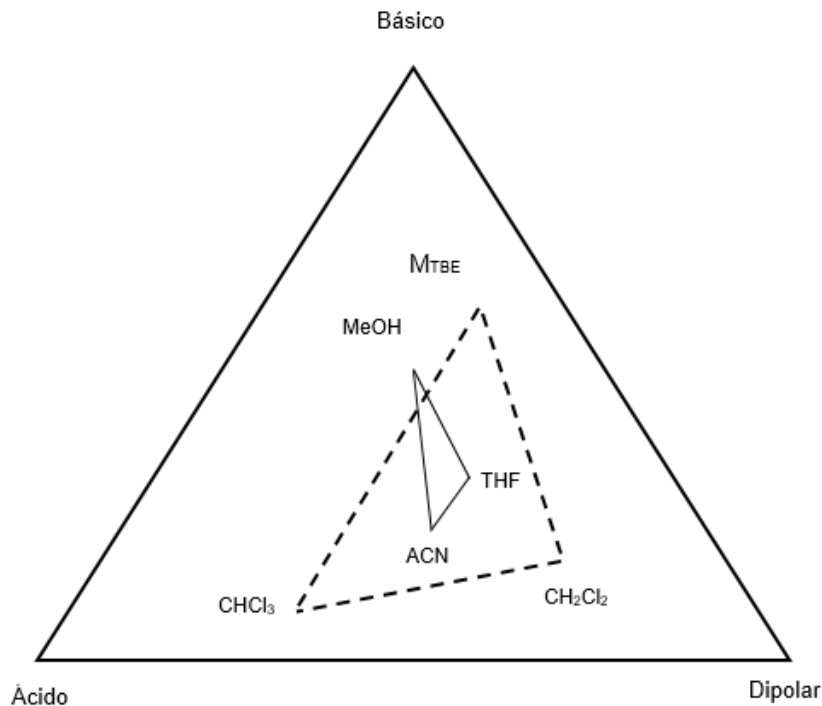
3TC: lamivudina; AZT: zidovudina; NVP: nevirapinam, T_R: tempo de retenção

(Fonte: adaptado de Lavra e colaboradores, 2008)

Quando houverem picos sobrepostos, uma alternativa para melhorar a resolução, é alterar a seletividade da fase móvel, até que se obtenha um fator de separação (α) adequado. Quando um analito não é solúvel em um determinado solvente, a seletividade da FM pode ser otimizada alterando-se um ou mais solventes sem modificar a polaridade (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Existem vários solventes disponíveis para utilização em CLAE, porém, alguns são mais comuns de serem empregados, e, portanto, surgiu o modelo do triângulo de solventes, como mostrado na Figura 8, em que estão representados os solventes mais utilizados em CLAE de FR e FN, e que a seletividade para tais modos de separação pode ser obtida ao se alternar os 3 solventes de seletividades diferentes. Para interpretar o triângulo de solventes, primeiro é preciso partir das características de polaridade do analito, selecionando a fase que será utilizada, normal ou reversa. Em seguida é necessário identificar se o analito de interesse é básico, ácido ou dipolar, e a partir dessas informações, é possível compor e testar as diferentes proporções de FM (SNYDER, L., KIRKLAND, J., DOLAN, J.2010) (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

Figura 7: Triângulo de seletividade para os solventes preferidos em: — fase reversa, - - - - - fase normal. MeOH: metanol; ACN: acetonitrila; THF: tetrahydrofurano, MTBE : éter metil terc-butílico ; CHCl₃ : clorofórmio; CH₂Cl₂ : cloreto de metileno



(Fonte: COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

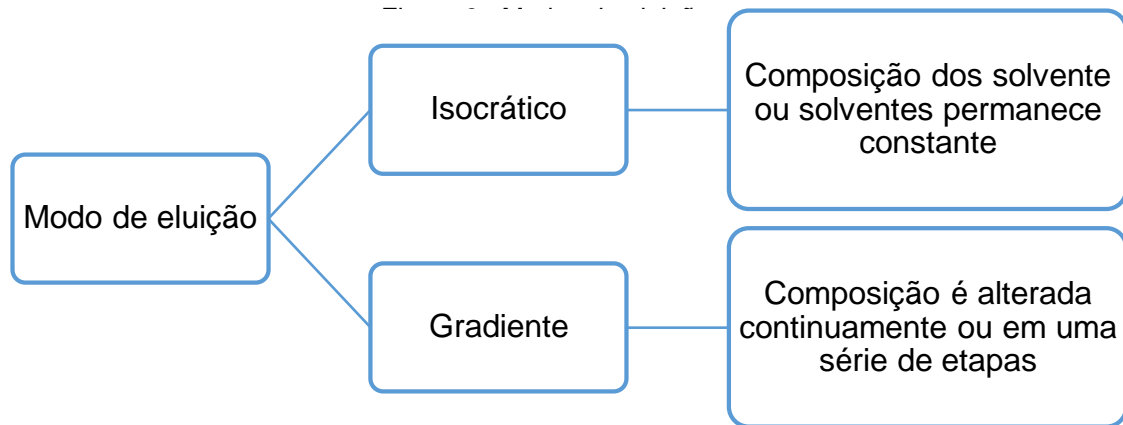
A utilização de solução tampão pode ser necessária, principalmente em alguns tipos de separação, como em modo reverso. As soluções tampão são empregadas quando compostos iônicos ou ionizáveis precisam ser separados e a análise precisa ser realizada em valores de pH bem definidos. Em um estudo realizado por Liew, Peh e Tan (2013), para desenvolver um método por CLAE –FR para quantificação de cloridrato de donepezila em comprimidos, foram testadas diferentes composições de FM, variando-se a proporção de acetonitrila, tampão fosfato e metanol, para determinar aquela que fornecesse resultados com melhor resolução, menor fator de cauda e menor tempo de retenção (LIEW, K.; PEH, K.; TAN, Y., 2013)

Os solventes selecionados para compor a FM devem produzir soluções homogêneas, pois caso contrário, quando há formação de sistemas imiscíveis, pode haver um comprometimento do cromatógrafo ou prejudicar as análises (COLLINS, C.; BRAGA G.; BONATO P., 2006).

5.1.3. Modo de eluição do processo

A separação por CLAE pode ocorrer de dois modos, como mostrado na figura 9:

Figura 9: Modos de eluição



O modo de eluição por gradiente é o mais amplamente empregado, principalmente em cromatografia em fase reversa. As modificações na composição da FM podem ocorrer por meio da variação de pH, da proporção dos solventes, na adição de aditivos específicos, ou pela combinação desses parâmetros. É usada basicamente para redução do tempo total das separações, promover estreitamento dos picos ou alterar os tempos de retenção de compostos principalmente quando estes estão em uma matriz complexa.

O modo de eluição isocrático é caracterizado por proporção constante dos constituintes da FM e apresenta como vantagem o fato da coluna permanecer em equilíbrio durante toda a análise, e com isso, aumentar a sua vida útil. Para se escolher qual dos dois modos utilizar, é preciso conhecer a quantidade de componentes a serem separados e suas características físico-químicas, como polaridade, entre outras (MOLDOVEANU, S., DAVID, V., 2017) (SHAH, B. et al., 2012).

Henriques e colaboradores (2017), no mesmo estudo de desenvolvimento de método de estabilidade da eremantolida C, utilizaram diferentes composições de fases móveis contendo metanol / água e acetonitrila / água, empregando sistema

isocrático e gradiente, e verificaram que o sistema gradiente forneceu o melhor fator de retenção para o analito de interesse (HENRIQUES, B., *et al.*, 2017).

5.1.4. Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

Existem diferentes parâmetros cromatográficos ou parâmetros de adequação do sistema cromatográfico que podem ser utilizados na identificação das condições que melhor se adequam aos objetivos ou aplicações do método. Dentre eles, os mais empregados são:

- a. Tempo de retenção (t_R), que é característico de um analito, em determinadas condições experimentais, porém não é específico;
- b. Número de pratos teóricos (N) que está relacionado a eficiência da coluna cromatográfica. Desejável: $N > 2000$; (SHABIR, 2003)
- c. Resolução (R_s), que indica o grau de separação entre picos adjacentes. Desejável: $R_s > 1,5$ (Brasil, 2010);
- d. Fator de cauda (TF), que indica a simetria do pico. Desejável: T igual a 1, (Brasil, 2010). Mas podem ser considerados adequados valores $\leq 2,0$ (SHABIR, 2003);
- e. Desvio padrão relativo (DPR): que está relacionado à precisão do sistema cromatográfico. Para o cálculo são realizadas injeções consecutivas de alíquotas obtidas de um único vial. Determinadas as áreas dos sinais cromatográficos e calculado o DPR estes resultados. Quando o limite de aceitação para o DPR especificado for $\leq 2,0\%$ utiliza-se 5 injeções da solução padrão. Para DPR especificado $> 2,0\%$ utiliza-se 6 injeções da solução padrão (Brasil, 2010).

Os parâmetros são utilizados para fins de adequação de um sistema cromatográfico, e assim servem para conferir se a resolução e reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão dentro das especificações para realizar as análises (BRASIL, 2010). A adequação do sistema, compreende uma verificação de todos fatores, para garantir a qualidade antes ou durante análise das amostras, e deve ser feita sempre que houverem mudanças significativas, como por exemplo, a troca de reagentes ou do equipamento.

Alhazmi e colaboradores (2018), durante o desenvolvimento de um método analítico, para garantirem que o sistema cromatográfico iria ter bom desempenho,

determinaram os seguintes parâmetros: número de pratos teóricos, tempo de retenção, resolução, fator de cauda e o desvio padrão relativo empregando 6 réplicas. Após testadas as diferentes condições cromatográficas, o sistema foi considerado adequado para a análise dos fármacos quando alcançava os seguintes limites desejáveis de $N > 2000$, $R > 1,5$, $T < 2,0$ DPR da área das seis replicatas da solução da SQR injetadas foi inferior a 2,0% (ALHAZMI, H., *et al.*, 2018).

Lavra e colaboradores (2008), testaram variações nos métodos já descritos na literatura e compêndios oficiais, para quantificação de antirretrovirais, e então, a partir dos cromatogramas obtidos, avaliaram a adequação do sistema cromatográfico considerando o fator de capacidade, número de pratos, fator de assimetria e resolução. Com base nesses parâmetros e os valores esperados, eles escolheram a melhor condição (LAVRA, Z., *et al.*, 2008).

Para melhor visualização, todos os parâmetros e suas respectivas fórmulas estão na tabela 3 (apêndice I).

5.2. Desenvolvimento e otimização de métodos por CLAE

Ao realizar a análise de um fármaco ou matéria-prima, deve-se recorrer primeiramente aos compêndios oficiais (farmacopeias). Quando o método já está disponível, é necessário que se utilize as mesmas condições descritas para verificar se os resultados atenderão às expectativas. Muitas vezes, há necessidade de otimizar o método descrito, ou seja, modificar algumas condições experimentais para melhorar o desempenho do sistema cromatográfico, pois podem haver distinções inter-laboratoriais que, conseqüentemente, afetam os resultados finais. Nas situações em que não existem métodos oficiais ou apenas dados na literatura, é preciso desenvolver o método.

A seleção das condições ótimas para operação da CLAE é complexa, principalmente quando se tem matrizes com vários componentes, pois muitas variáveis devem ser observadas durante a otimização, dentre elas cita-se: composição da FM, fluxo, temperatura, escolha da FE. O desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE geralmente é baseado no processo de tentativa e erro, sendo assim um trabalho exaustivo (KLEIN, E., RIVERA, S., 2000). Com os avanços tecnológicos, grande parte do desenvolvimento e melhorias de métodos por CLAE podem ser avaliados utilizando softwares, que por uma análise estatística, fornecem

dados de quais são as melhores condições para serem empregadas em cada estudo envolvendo experimentos químicos, este estudo é denominado quimiometria (FERREIRA, M., et al., 1999).

Alhazmi e colaboradores (2018), após verificarem na literatura que não havia nenhum método descrito para quantificação simultânea dos agentes anti-hipertensivos sinvastatina, atorvastatina, telmisartan e irbesatan, na forma de comprimidos e a granel, desenvolveram um método por CLAE para tal finalidade. Eles otimizaram alguns parâmetros cromatográficos após diversos testes, e dentre as condições analíticas que eles modificaram tem-se: tampões com diferentes valores de pH para compor a FM, distintas proporções dos constituintes da de FM e dois diferentes comprimentos de onda para detecção (ALHAZMI, H., *et al.*, 2018).

Simon, Cabral e Sousa (2008), no estudo de desenvolvimento de um método para quantificação simultânea de dipropionato de betametasona e fosfato sódico de betametasona em suspensão injetável, realizaram primeiramente uma extensa busca pela literatura, encontraram um artigo que detalhava o desenvolvimento de um método para quantificação simultânea dos fármacos, mas não obtiveram resultados satisfatórios. Em seguida, testaram diferentes condições cromatográficas contidas nas monografias individuais de cada fármaco que estavam descritas na Farmacopeia Americana. Distintas situações foram testadas, onde eles variaram: composição e fluxo da FM, modo de eluição (isocrático e gradiente), tempo de corrida, e selecionaram as condições que proporcionaram o melhor resultado para os parâmetros de adequação do sistema (SIMON,A.; CABRAL, L.; SOUZA, V., 2012).

Lavra e colaboradores (2008), no estudo de desenvolvimento de um método para determinação simultânea de 3 antirretrovirais em comprimidos dose-fixa, iniciaram o trabalho realizando a quantificação individual dos fármacos, conforme as monografias individuais descritas na Farmacopeia Brasileira 4ª edição. O desenvolvimento do método iniciou-se com uma varredura do espectro eletromagnético na faixa do UV-Vis, para encontrar o comprimento de onda em que os 3 fármacos associados teriam valores semelhantes. Sequencialmente, realizaram buscas na literatura sobre métodos já existentes para quantificação desses antirretrovirais, e posteriormente testaram diferentes variações, avaliando a FE, FM, fluxo e o volume de injeção. Obtidos então os cromatogramas, eles verificaram qual o método mais adequado com base nos parâmetros de adequação

do sistema cromatográfico (LAVRA, Z., et al, 2008).

Ghari, Kobarfardb, Mortazavi (2013), realizaram um trabalho para desenvolver um método simples por CLAE em fase reversa com detecção na região do ultravioleta, para determinação da azitromicina a granel e em diferentes formas farmacêuticas. Após buscas bibliográficas, eles verificaram a existência de um método para análise desse fármaco, porém, o intuito do trabalho era desenvolver um método que fosse capaz de detectar a azitromicina, em pequenas concentrações. Para obter o melhor método, os autores utilizaram diferentes colunas adequadas a utilização em fase reversa. Fizeram ensaios para definir o comprimento de onda onde o sinal cromatográfico apresentou maior intensidade e mostrou-se mais adequado para a determinação da azitromicina. Foram testadas diferentes proporções de solventes que compunham a FM, bem como o efeito da variação do pH nas separações realizadas (GHARI, T.; KOBARFARDB, F.; MORTAZAVIA, S., 2013).

No trabalho para desenvolver um método cromatográfico para quantificação do succinato de trelagliptina e subprodutos, Luo e colaboradores (2018), determinaram, a priori, o comprimento de onda que permitisse alcançar os resultados mais adequados aos parâmetros de adequação do sistema. Em seguida, selecionaram qual FE seria a mais propícia para a análise, e por fim, estabeleceram a FM (LUO, Z., et al., 2018).

Durante o desenvolvimento de um método, por Henriques e colaboradores (2017), para quantificar uma lactona sesquiterpênica obtida de um extrato vegetal, diferentes fatores foram alterados, dentre eles: o modo de eluição, a composição da FM e a FE. O método final obtido, quando comparado com os dados da literatura, se mostrou melhor, porque reduziu o tempo de análise e o consumo de solvente.

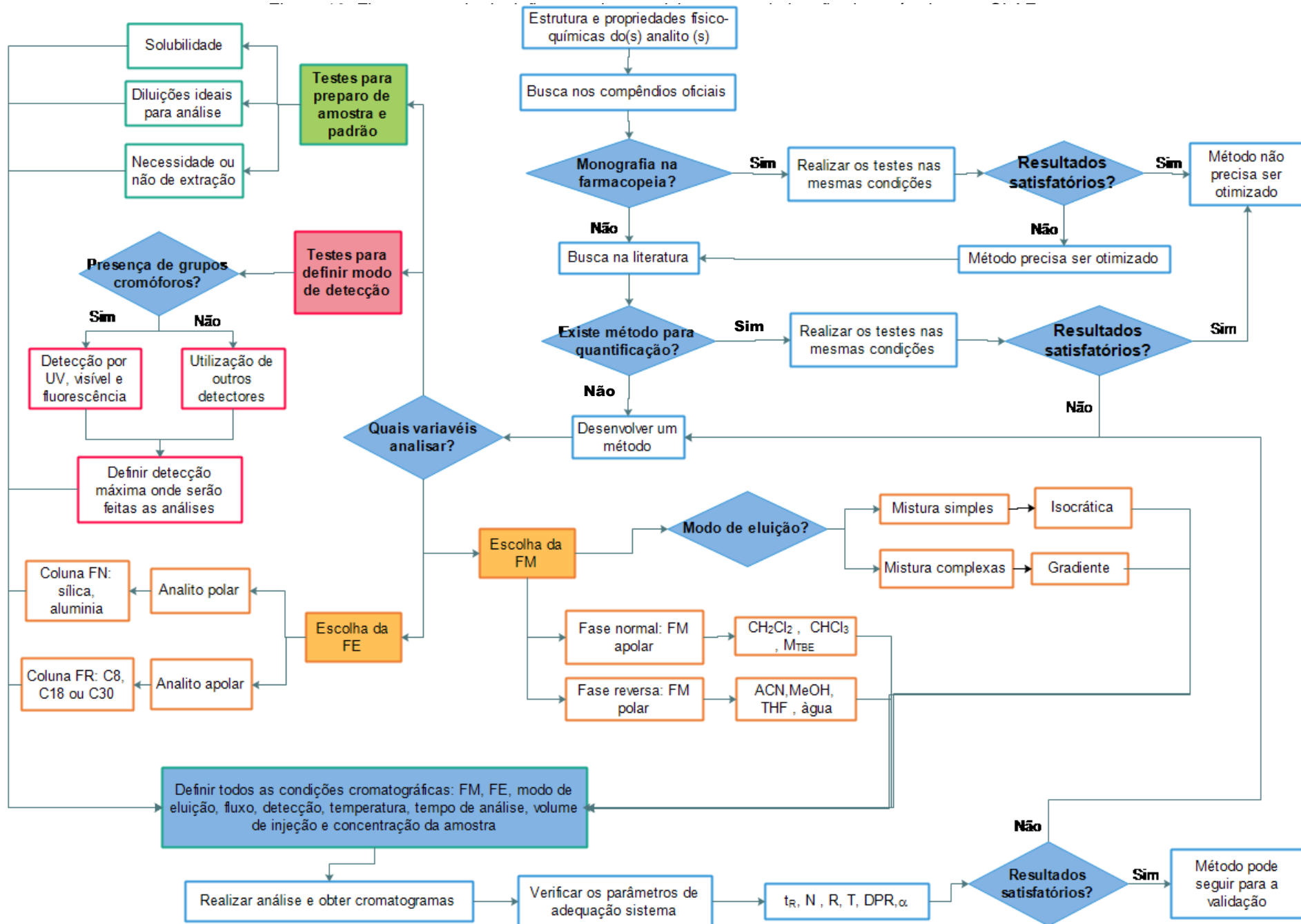
Para o desenvolvimento e otimização de método por CLAE, não existe uma regra a ser seguida. Ambos os processos dependem: das características do analito em questão, das condições disponíveis no laboratório que se realiza a análise e da finalidade do estudo, mas alguns procedimentos são considerados “chave”, para que se atinja os resultados desejados de maneira mais eficiente.

5.3. Fluxograma de decisão para desenvolvimento e otimização dos métodos por CLAE

O fluxograma, é um diagrama que permite a visualização das etapas existentes dentro de uma sequência de processos, e com isso, fornece coordenadas para o desenvolvimento, seja de um método, atividade ou processo, para que ao final se obtenha um resultado satisfatório. É um método que apresenta características positivas, como a sua representação simbólica simples que leva à facilidade de interpretação e também a facilidade de apresentação do modelo para terceiros. Além disso, a utilização dessa estratégia, racionaliza qualquer atividade, otimizando os resultados esperados para qualquer processo (DEBASTINI, C., 2014).

Para se construir qualquer tipo de fluxograma é necessário definir uma meta, organizar os processos em ordem cronológica, pensar no público alvo e também fazer um esboço, para facilitar na hora da confecção final do mesmo.

Os dados obtidos durante as pesquisas bibliográficas foram sumarizados na forma de um fluxograma de decisão (figura 10), como apresentado no presente trabalho, e este foi desenvolvido com intuito de gerar um material bibliográfico, que pudesse auxiliar os analistas no desenvolvimento e otimização de um método para quantificação de fármaco por CLAE, para que o processo se tornasse menos extenso, mais objetivo e eficiente.



6. CONCLUSÃO

Por meio da busca bibliográfica foi possível fazer o mapeamento dos principais parâmetros cromatográficos e condições empregadas para desenvolver um método analítico por CLAE para quantificação de fármaco. Foram abordados a composição da FM, os tipos de FE, modos de eluição e parâmetros de adequação do sistema. Com o presente trabalho foi possível selecionar quais destes parâmetros são mais comumente modificados e como a sua seleção pode influenciar no processo cromatográfico.

O estudo de alguns métodos cromatográficos já publicados com base no texto elaborado neste trabalho possibilitou verificar os diferentes procedimentos empregados pelos autores para desenvolver ou obter um método otimizado para quantificação de fármacos, e por meio de análise comparativa, pode-se observar que existem diferentes formas para se chegar a um resultado satisfatório, mas todas passam por etapas comuns, como por exemplo, a análise da estrutura do fármaco para a seleção das condições cromatográficas.

Neste trabalho foi possível elaborar um fluxograma de decisão, explicitando as etapas a serem seguidas durante a otimização e desenvolvimento de um método por CLAE, partindo da análise das características físico-químicas do analito.

7. REFERÊNCIAS

AHUJA, Satinder; RASMUSSEM, Henrink. **HPLC method development for pharmaceuticals**. U.S.A.: Elsevier Academic Press, 2007. 553 p. v. 8.

ALHAZMI, Hassan A. et al. **A fast and validated reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of simvastatin, atorvastatin, telmisartan and irbesartan in bulk drugs and tablet formulations**. Scientia Pharmaceutica, [S.L.] v. 86, n. 1, p. 57-63. 2018.

BORGES, Endler Marcel; GORAIEB, Karen; COLLINS, Carol H. **O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações**. Revista Química Nova, Campinas - SP, v. 35, n. 5, p. 993-1003, jan. 2012.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, volume 1, 5. ed. Brasília, p. 109-114, 2010.

CHUST, Rafael Berbert. **Introdução cromatografia de líquidos (HPLC)**. Boletim SPQ, [S.I.], v. 39, p. 43-53, jan. 1990.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., **Cromatografia líquida de alta eficiência**. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3ªed., UNICAMP, São Paulo. p .179 – 243, 1988.

COLLINS, C.H, BRAGA G. L, BONATO P.S, **Fundamentos de cromatografia**, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

COLLINS, Carol H. **Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia**. Scientia Chromatographica, Campinas, SP, v. 1, n. 1, p. 7-20, 2009.

COSKUN, Ozlem. **Separation techniques: Chromatography**. North Clin Istanbul, Canakkale, Turquia, v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.

DEBASTIANI, Carlos Alberto. **Definindo escopo em projetos de software**. São Paulo: Novatec, 2014. 144 p.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. **Cromatografia: um breve ensaio**. Atualidades em Química, [S.I.], n. 7, p. 21-25, maio. 1998.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 8. ed. EDQM: Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia; Strasbourg, France, 2013.

FERREIRA, Márcia M. C. et al. **Quimiometria I: calibração multivariada, um**

tutorial. Química Nova, Campinas, v. 22, n. 5, p. 724-731, jan. 1999.

FIGUEIREDO, Tânia Margarida Pereira. **Validação de métodos analíticos: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimenta.** Dissertação (Departamento de Química) - Universidade de Coimbra, 2012.

GHARI, Tayebah; KOBARFARDB, Farzad; MORTAZAVIA, Seyed Alireza. **Development of a simple RP-HPLC-UV method for determination of azithromycin in bulk and pharmaceutical dosage forms as an alternative to the USP method.** Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Iran, v. 12, p. 57-63, dez. 2013.

GLÖCKNER, G. **Polymer Characterization by Liquid Chromatography**, 1^a. ed. [S.I.]: Elsevier Science, 585 p. v. 34, 1887.

GONÇALVES, Alexandra Filipa Pereira. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para pesquisa de 2-feniletilaminas em fluidos biológicos.** 2011. 156 p. Dissertação (Mestrado em Química)- FACULDADE DE CIÊNCIAS, UNIVERSIDADE DE LISBOA, LISBOA, 2011.

HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. 1^a ed. EUA: McGraw-Hill Companies, Inc., International Edition, p.544-577, 2000

HENRIQUES, Bárbara O. et al. **Development and validation of a stability indicating method for quantification of the sesquiterpene lactone eremantholide C from *Lychnophora trichocarpa* (Brazilian arnica).** Brazilian Journal of Pharmacognosy, Ouro Preto - MG, v. 27, p. 502-509, jan. 2017.

KAZAKEVICH, Yuri; LOBRUTTO, Rosario. HPLC for pharmaceutical scientists: 1. United States of America: Wiley, p.1108, 2007.

KLEIN, E.J; RIVERA, S. L. **A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale hplc separations.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, [S.I.], v. 23, p. 2097-2121, 2000.

KUMAR S.D. and KUMAR H.D.R. **Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development- A Review** Int J Pharm Sci Res. 3(12); 4626-4633, 2012.

LANÇAS, Fernando M. **Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde?** Scientia chromatographica, São Carlos, SP, Brasil, v. 3, n. 1, p. 17-23, 2011.

LANÇAS, Fernando M., Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (HPLC). *Scientia Chromatographica*, São Carlos, SP, Brasil, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012.

LAVRA, Zênia Maria Maciel et al. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência.** *Química Nova*, Recife -PE, v. 31, n. 5, p. 969-974, 2008

LIEW, Kai Bin; PEH, Kok Khiang; TAN, Yvonne Tze Fung. **RP-HPLC analytical method development and optimization for quantification of donepezil hydrochloride in orally disintegrating tablet.** *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Malaysia, v. 26, n. 5, p. 961-966, set. 2013.

LUO, Zhiqiang et al. **Development of a validated HPLC method for the quantitative determination of trelagliptin succinate and its related substances in pharmaceutical dosage forms.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, China, v. 111, p. 458-464, jan. 2018.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. **Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.** *Revista Química Nova*, Campinas - SP, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.
MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. , **A new form of chromatogram employing two liquids phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application to the microdetermination of the higher monoamino-acids in proteins.** *J. Biochem*, [S.I.], v. 35, p. 1358-1368. 1941.

MEYER, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography*. 4 ed. John Wiley & Sons, 2004.

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor, **Selection of the HPLC method in chemical analysis**, [S.L.]: Elsevier. p. 588, 2017

O que é um fluxograma?. 2018 Disponível em: <<https://www.lucidchart.com/pages/pt/o-que-e-um-fluxograma>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

RAMOS, Rodrigo Ricardo. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo.** 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo', São Paulo, 2014.

SAHU, P.K, et al., **An overview of experimental designs in HPLC method development and validation**, *J. Pharm. Biomed. Anal.* [S.L.] v. 147, p. 590-611, 2018.

SHAH, Bhoomi P. et al. **Stability indicating hplc method development: A REVIEW**. International Journal of Pharmaceuticals Science and Research, India, v. 3, n. 9, p. : 2978-2988 , ago. 2012.

SILVA, Patrícia Damasceno. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. 136 p. Dissertação (Química Industrial)- UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR, Covilhã, 2012.

SHABIR, Ghulam A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization**. Journal of Chromatography A, [S.l.], v. 987, p. 55-66, jan. 2003.

SIMON, Alice; CABRAL, Lúcio Mendes; SOUZA, Valeria Pereira de. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para a quantificação simultânea de dipropionato de betametasona e fosfato sódico de betametasona em suspensão injetável**. Química Nova, Rio de Janeiro - RJ, v. 35, n. 3, p. 593-600, jan. 2012

SINGH, Anil Kumar; KEDOR-HACKMANN, Érika Rosa Maria ; SANTORO, Maria Inês Rocha Miritello. **Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 553-566, dez. 2006.

SKOOG, Douglas; WEST, Donald M; HOLLER, F. James. Cromatografia líquida de alta eficiência; In: Fundamentos de química analítica: 8.ed. [S.L.]: Thomson. p .924, 2005

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. Introduction to modern liquid chromatography. 3 ed. United States of America: Wiley. p. 912, 2010

SWARTZ, Michael. **HPLC detectors: a brief review**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Massachusetts, v. 33, p. 1130-1150, 2010.

TONHI, Edivan et al. **Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizado**. Química Nova, Campinas, SP, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 37. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2014

ZANELLA, Renato. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): Conceitos Básicos, Instrumentação, Aplicações. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/larp/media/hplc_geral_colorido.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2018

ZOCOLO, Guilherme Julião. **Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 2012

ZOTOU, Anastasia . An overview of recent advances in HPLC instrumentation. Central European Journal of Chemistry , Grécia, v. 10, n. 3, p. 554-569, . 2012.

APÊNDICE I

Tabela 3: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

Parâmetro	Fórmulas
Tempo de retenção reduzido (t_R')	$t_R' = t_R - t_M$
Volume de retenção reduzido (V_R)	$V_R' = V_R - V_0$
Fator de retenção (k)	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$
Seletividade (α)	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0}$
Número de pratos teóricos (N)	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$ ou $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$
Altura dos pratos teóricos (H)	$H = \frac{L}{N}$
Resolução (R)	$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 - W_2}$ ou $R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{W_{1,h/2} - W_{2,h/2}}$
Fator de cauda (T)	$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$
Fator de assimetria (A_s)	$A_s = \frac{B}{A}$

t_R : tempo de retenção; t_M : tempo morto; V_R : volume de retenção; V_0 : volume morto; W : largura do pico na linha de base, $W_{h/2}$: largura do pico a meia altura; $W_{0,05}$: largura do pico a 5% da altura; L : comprimento da coluna, A : distância da frente do pico ao máximo; B : distância do máximo ao final do pico.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



ATESTADO DE CORREÇÃO

Atesto que **SILMARA LEÔNCIO BRAGA**, matrícula 14.1.2137 realizou todas as correções exigidas pela Banca examinadora no manuscrito do Trabalho de Conclusão de Curso: **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos.**

Ouro Preto, 03 de julho de 2018.

Profa. Dra. JACQUELINE DE SOUZA
Orientadora - DEFAR-EF-UFOP