

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS

FIOCRUZ

EDMILSON MUNIZ DE OLIVEIRA

A COLUNA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA:

USO, CONTROLES E DESCARTE

Rio de Janeiro

2016

EDMILSON MUNIZ DE OLIVEIRA

**A COLUNA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA:
USO, CONTROLES E DESCARTE**

Monografia apresentada ao Curso de Pós Graduação Latu Sensu do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos / FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Mary Gomes de Barros, MSc.

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

O48c Oliveira, Edmilson Muniz de

A coluna de cromatografia líquida: uso, controles e descarte. /
Edmilson Muniz de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2016.

xiii, 40 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: MSc. Mary Gomes Barros.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-
Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais
Farmacêuticas, 2016.

Bibliografia: f. 40

1. Evolução da Coluna Cromatográfica. 2. Técnica Cromatográfica. I.
Título.

CDD 615.1

EDMILSON MUNIZ DE OLIVEIRA

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação Lato Sensu do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos / FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Mary Gomes de Barros, MSc.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Mary Gomes de Barros, MSc em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Farmanguinhos / FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

Prof^a. Dra Maria das Dores Dutra Behrens, DSc em Química, Hanover, Alemanha

Prof. Igor Cunha Cardoso, MSc em Química, IQ / UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

DEDICATÓRIA

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus amáveis e eternos pais Damião e Delizete, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Dedico e reconheço a vocês, com imensa gratidão e amor, este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por tudo que me concedeu.

À minha querida mãe, Delizete, pelo grande amor a mim ofertado.

Ao meu pai Damião, sempre lembrado como exemplo de abnegação e dedicação para nos criar.

À minha companheira Marcia Muniz, pela paciência a mim outorgada.

Ao meu querido filho Daniel, deixo este legado: a educação.

Aos meus parentes, dos quais muitos distantes, sempre estiveram presentes.

A minha orientadora Mary Barros, que mesmo no meu estado “bruto”, foi paciente para me “lapidar”, muito contribuindo para o meu progresso.

À coordenadora do curso Carmen Pagotto, e a todos envolvidos, pela dedicação amor e por acreditar em nós.

Aos excelentes colegas/amigos, com os quais tive a grande oportunidade de compartilhar este curso, fica a gratidão de compartilhar muitos momentos bons durante esta Especialização.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu sucesso, em mais esta conquista.

Há bons tempos para gestar sonhos. A
semeadura foi feita para que nasça a planta e
que frutifique produzindo mais sementes.
Então, haverá tempos para novos semeares.
(CHASSOT, 2006)

RESUMO

A Cromatografia Líquida é uma técnica fundamental na separação e identificação de substâncias químicas que envolvem duas fases imiscíveis, a fase estacionária e a fase móvel. As rotinas analíticas cromatográficas são aplicáveis aos laboratórios de controle de qualidade, de variadas atividades industriais, como também são aplicáveis a laboratórios de centros de pesquisas, de múltiplos objetivos, seguindo a legislação vigente. A evolução da coluna cromatográfica ocorreu juntamente com a evolução de todos os demais componentes de um sistema cromatográfico, tornando esta técnica de aplicação generalizada, com custos cada vez mais reduzidos. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão da literatura demonstrando a evolução e a importância da coluna cromatográfica na cromatografia líquida, suas aplicações nas rotinas analíticas nos laboratórios de controle de qualidade e aspectos regulatórios que controlam a utilização destas colunas. Este estudo pode confirmar a importância da evolução da técnica de cromatografia líquida, e, ao mesmo tempo, da evolução das colunas cromatográficas, devido à otimização de tempo de análise, da capacidade de seletividade, da eficiência da metodologia, precisão de resultados e baixo consumo de solventes, permitindo a identificação e/ou a quantificação dos compostos presentes com confiabilidade e baixo custo operacional.

Palavras-chave: Evolução da coluna cromatográfica; técnica cromatográfica.

ABSTRACT

Liquid chromatography is a fundamental technique in the separation and identification of chemical substances involving two immiscible phases, the stationary phase and the mobile phase. Chromatographic analytical routines are applicable to quality control laboratories of various industrial activities, as also are applied to research centers, laboratories of multiple goals, according to the current legislation. The evolution of the chromatographic column occurred with the evolution of all other components of a chromatographic system, making this widespread application technique with ever lower costs, with a wide range of manufacturers and a continuous improvement of its results. The aim of this study was to review the literature demonstrating the evolution and importance of the chromatographic column in liquid chromatography, its applications in analytical routines in quality control laboratories and regulatory aspects that control the use of these columns. This study can confirm the importance of the development of the technique of performance liquid chromatography, and, at the same time, the development of chromatographic columns, due to the time of analysis, optimization of the capacity of selectivity, efficiency of the methodology, accuracy of results and low solvent consumption, allowing for the identification and/or quantification of compounds with reliability and low operating costs.

Key words: Evolution of the chromatographic column; chromatographic technique.

Lista de Ilustrações

Figura 1 –	Esquema de cromatografia líquida segundo Tswet	14
Figura 2 –	Esquema de equipamento de cromatografia	17
Figura 3 –	Colunas atuais para cromatografia líquida.....	20
Figura 4 –	Cromatograma.....	22
Figura 5 –	Classificação USP para colunas cromatográficas	24
Figura 6 –	Gráfico de eficiência da coluna cromatográfica	25
Figura 7 –	Separação cromatográfica entre duas substâncias	27
Figura 8 –	Representação da resolução R	28
Figura 9 –	Cromatograma com assimetria de pico	29

Lista de Tabela e Quadros

Tabela 1 -	Ativação de coluna cromatográfica	35
Quadro 1 -	Registro de uso de coluna cromatográfica.....	37

Quadro 2 - Registro de limpeza de colunas cromatográficas.....

38

Lista de abreviaturas e siglas

FB - Farmacopeia Brasileira

USP- *United States Pharmacopeia*

DMSO- Sulfóxido de dimetila

DMF- Dimetilformamida

HMPA- Hexametilfosforotriamida

Lista de símbolos

CaCO_3 - Carbonato de Cálcio

C₁ - Metilsilano
C₄ - Mutilsilano
C₈ - Octilsilino
C₁₈ – Octadecilsilano
CH₃CN- Acetonitrila
C₃₀ – Triacosilsilano(conferir)
CN - Nitrila

SUMÁRIO

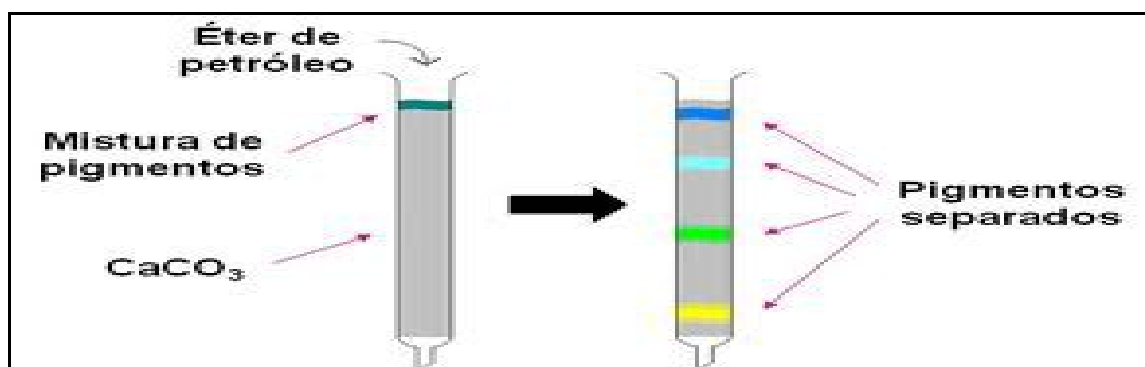
1. Introdução.....	14
2. Desenvolvimento.....	16

2.1	Conceituação geral.....	16
2.2	Colunas de cromatografia líquida.....	18
2.3	Colunas de cromatografia líquida na atualidade	22
2.4	Descrição de coluna cromatográfica.....	23
2.5	Eficiência da coluna cromatografia x tamanho de partícula.....	25
2.6	Resolução (R).....	26
2.7	Fator de calda.....	28
2.8	Adequabilidade do sistema.....	29
2.9	Problemas analíticos atribuídos à coluna cromatográfica.....	30
2.9.1	Limpeza.....	31
2.9.2	Regeneração.....	31
2.10	Recomendações e cuidados para o uso de colunas cromatográficas	32
2.11	Estocagem.....	33
2.12	Ativação de coluna cromatográfica nova ou armazenada por longo período...	34
2.13	Uso de colunas cromatográficas	35
2.13.1	Registro de uso de colunas cromatográficas	35
2.13.2	Ficha de registro de uso de coluna cromatográfica	36
2.13.3	Ficha de registro de limpeza de coluna cromatográfica	37
3.	Conclusão.....	39
	Referências Bibliográficas	40

1. INTRODUÇÃO

A Cromatografia líquida é uma técnica físico-química de separação. Este método é fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido às diferentes interações entre as substâncias da amostra e as duas fases imiscíveis, ou seja, a fase estacionária e a fase móvel. A grande variedade de combinações entre essas fases torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação laboratorial. O objetivo da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel). Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e viajam mais lentamente que a fase móvel devido ao efeito retardante da fase estacionária. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema. O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída ao botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett. Este botânico criou o termo ao descrever suas experiências no estudo da clorofila nas plantas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) no extrato de folhas, através de uma coluna de vidro aberta preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), levou à separação dos componentes em faixas coloridas (Figura 1). Este é, provavelmente, o motivo pelo qual a técnica ficou conhecida como cromatografia (do grego *chrom* – cor e *graphie* – escrita) (Collins, 2009).

Figura 1 - Esquema de cromatografia líquida segundo Tswett



Fonte: www.biomedicinabrasil.com (2012)

O termo cromatografia pode gerar a ideia errada de que o processo de separação esteja relacionado com a cor, enquanto que, na realidade está relacionado aos componentes da amostra. A técnica cromatográfica, com o decorrer das décadas, tornou-se uma ferramenta analítica extremamente eficiente e versátil, resultado do grande desenvolvimento de seus acessórios, incluindo, a evolução de um de seus componentes, a coluna cromatográfica, objeto deste estudo. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão da literatura demonstrando a evolução e a importância da coluna cromatográfica na cromatografia líquida, suas aplicações nas rotinas analíticas nos laboratórios de controle de qualidade na indústria farmacêutica e aspectos regulatórios que controlam a utilização destas colunas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Conceituação Geral

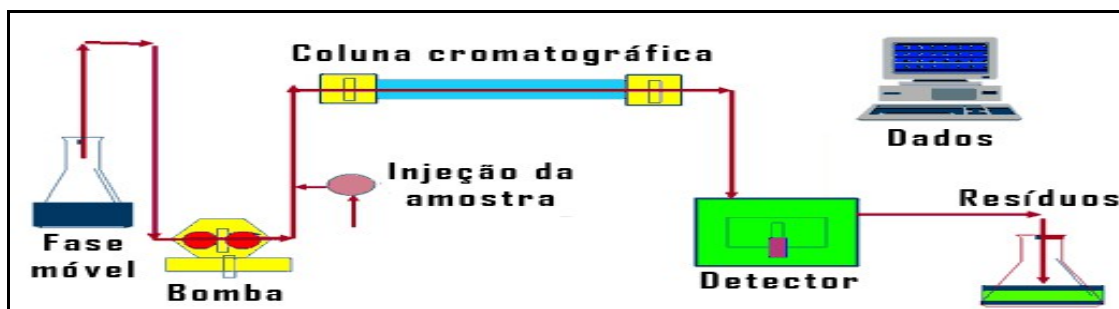
A cromatografia líquida é uma técnica de separação de diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel).

A titulometria foi à primeira técnica de análise para quantificar uma substância contida em um meio de solução. A titulometria ou titulação é uma técnica comum de laboratório de análise química quantitativa que determina a concentração de uma solução. O método consiste em reagir totalmente um volume conhecido de uma amostra com um volume determinado de um reagente de natureza e concentração conhecida (solução padrão).

Logo após a titulometria veio à espectrometria. Estas técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, podendo ser utilizado como técnica de identificação e quantificação de substâncias.

Um diagrama de blocos de um cromatógrafo a líquido está representado na Figura 2, onde estão apresentados, sistematicamente, os diversos componentes deste equipamento.

Figura 2 – Esquema de equipamento de cromatografia



Fonte: www.biomedicinabrasil.com (2012)

O esquema acima demonstra como funciona a técnica de cromatografia líquida. Neste esquema estão destacados os seguintes componentes: reservatório de fase móvel, bomba, válvula de injeção da amostra, coluna cromatográfica, detector, sistema de dados e reservatório de resíduos. Estas etapas estão descritas a seguir.

A primeira etapa da análise cromatográfica é o preparo da fase móvel. Por fase móvel entende-se uma mistura de solventes orgânicos e/ou inorgânicos de alto grau de pureza, ou simplesmente um desses solventes puros. Em uma eluição isocrática os solventes da fase móvel podem ser misturados antes da análise ou podem ser misturados pela bomba do equipamento. Neste tipo de eluição a composição da fase móvel permanece constante durante toda análise. Em uma eluição gradiente os solventes da fase móvel são misturados pela bomba e mudam a sua proporção durante a análise, conforme o método analítico empregado. A fase móvel faz o transporte da amostra através do caminho cromatográfico, gerando dados como tempo de retenção, intensidade, área e concentração de uma determinada substância.

A segunda etapa é o bombeamento da fase móvel através da coluna cromatográfica. Esta movimentação é feita por uma bomba que deve proporcionar uma vazão contínua ao sistema, sem pulsos, com alta reprodutibilidade, para possibilitar a eluição da fase móvel com um fluxo adequado, durante todo o comprimento da coluna cromatográfica.

A terceira etapa é a injeção da amostra no sistema cromatográfico. A amostra é introduzida através de uma válvula, com o uso de uma seringa, diretamente no fluxo da fase móvel em movimento, pela ação da bomba.

A quarta etapa é a separação das diversas substâncias presentes na amostra injetada, realizada na coluna cromatográfica.

A quinta etapa é a detecção das substâncias que foram separadas pela coluna cromatográfica. O detector transforma a quantidade de substância recebida em sinais eletrônicos e transfere estes dados para um sistema de captura de sinais, normalmente um computador acoplado ao cromatógrafo.

A sexta etapa é o tratamento de dados, através de software em um computador, apresentando informações em forma numérica e em apresentação gráfica, que relaciona a intensidade dos picos em unidade de área com seus respectivos tempos de retenção. Este gráfico é amplamente conhecido em cromatografia como Cromatograma.

A sétima etapa é a purga. A purga é uma etapa de limpeza que tem como objetivo reduzir ao máximo os teores das substâncias analisadas que podem contaminar o sistema cromatográfico e a coluna cromatográfica.

2.2 Coluna de cromatografia líquida

Conforme o esquema cromatográfico, apresentado na Figura 2, a coluna cromatográfica separa substâncias presentes em uma amostra injetada, e, esta separação permite que tais substâncias sejam identificadas e quantificadas.

A importância da ação da coluna cromatográfica é o objeto deste estudo, que se propõe em apresentar a composição física, o conceitual teórico, a atuação, a recuperação e os controles exigidos pela vigilância sanitária sobre este recurso analítico.

Segundo Collins, Braga e Bonato (1993) a versatilidade desta técnica reside na variedade de colunas cromatográficas disponíveis no mercado, contendo grandes variedades de fases estacionárias.

Por fase estacionária compreende-se um suporte que preenche e permanece fixo no interior da coluna cromatográfica. As interações entre o soluto e a fase acontecem na superfície deste suporte e essas interações, juntamente com as interações com a fase móvel, são responsáveis pelas separações.

Conforme a composição da fase estacionária, a cromatografia é utilizada em várias áreas da ciência, como, por exemplo, no acompanhamento de sínteses; em análises de pesticidas e de feromônios; no isolamento de produtos naturais e sintéticos; na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações.

Nos primórdios da cromatografia líquida, a coluna cromatográfica usada por Tswet para separar substâncias era um tubo de vidro, contendo CaCO_3 como fase estacionária. Na parte superior do tubo de vidro era aplicada a amostra, seguida da adição de um solvente orgânico, neste caso, o éter de petróleo, como fase móvel. A fase móvel é a responsável por movimentar, ou eluir, a amostra através da fase estacionária, resultando na separação das substâncias componentes da amostra. Esta separação era constatada, visualmente, nas diferentes cores presentes no final do ensaio.

A técnica cromatográfica passou por grande evolução, contudo, a ideia básica de movimentação da amostra através da fase estacionária, pelo uso da fase móvel, continua a mesma da concepção de Tswet.

A mudança na técnica de cromatografia líquida ocorreu pela diminuição do tamanho de partículas e da especificidade da fase estacionária, permitindo grande avanço na separação de substâncias. A detecção deixou de ser visual para gerar dados mais precisos em relação às substâncias isoladas e suas respectivas concentrações.

O desempenho da coluna cromatográfica é expresso em número de pratos teóricos ou a altura equivalente do prato teórico.

Por prato teórico entende-se uma camada imaginária dentro de uma coluna cromatográfica que ajuda a interpretar o processo de separação. Um número maior de pratos teóricos ou uma menor altura relativa do prato teórico corresponde a uma melhor eficácia da coluna cromatográfica (Juliano, 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência apresenta vários modelos atuais de colunas para cromatografia líquida, com suas extremidades devidamente fechadas para evitar perda da fase estacionária.

A Figura 3 – Colunas atuais para cromatografia líquida



Fonte: www.biomedicinabrasil.com (2012)

Collins, Braga e Bonato (1993) publicaram um trabalho avaliando a evolução da coluna para cromatografia líquida, entre 1950 e 1990 conforme apresentado a seguir.

Estes pesquisadores descreveram que, em 1950, eram usadas colunas para cromatografia líquida recheadas com partículas com diâmetros irregulares entre $100\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$. Tais colunas cromatográficas alcançavam eficiências de apenas 200 pratos teóricos/15 cm.

Na década de 1960 foram disponibilizadas, comercialmente, as colunas cromatográficas recheadas com partículas peliculares rígidas com diâmetro entre $40\mu\text{m}$ - $50\mu\text{m}$, mecanicamente resistentes e, dessa forma, próprias para serem usadas sob pressão. Estas partículas ofereciam maiores eficiência, resolução e assimetria, com cerca de 1000 pratos/15cm, devido à taxa rápida de transferência da massa resultante da camada porosa fina das partículas peliculares, porém, apresentavam baixa área superficial e, conseqüentemente, baixa capacidade de amostra, ou seja, pouca interação química. Essas partículas ainda são utilizadas nos dias atuais, com algumas modificações, na cromatografia clássica em escala preparativa, em que há não necessidade do uso de altas pressões.

Durante os anos 70, ocorreu a transição para partículas porosas menores, com diâmetro em torno de $10\mu\text{m}$, tendo a finalidade de contornar as desvantagens de baixa eficiência na separação e na resolução, apresentadas pelas partículas de diâmetro maior e pelas partículas peliculares. As colunas cromatográficas recheadas com partículas de $10\mu\text{m}$ apresentaram melhores resultados quanto à eficiência,

cerca de 6000 pratos/15cm, quando comparadas às existentes até então. Essas partículas demandam o uso de altas pressões para acelerar a passagem da fase móvel e fornecer resultados mais rápidos, o que levou ao desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 2). Entretanto, a reprodutibilidade do enchimento destas colunas cromatográficas com partículas menores e irregulares tornou-se um desafio, desafio este que permaneceu até serem desenvolvidas colunas cromatográficas com partículas esféricas.

A partir dos anos 80, com a introdução das partículas esféricas, o desenvolvimento voltou-se basicamente para a redução do diâmetro das partículas da fase de estacionária. As primeiras partículas esféricas desenvolvidas possuíam diâmetro de 5 μ m e apresentavam a eficiência de 12000 pratos/15 cm.

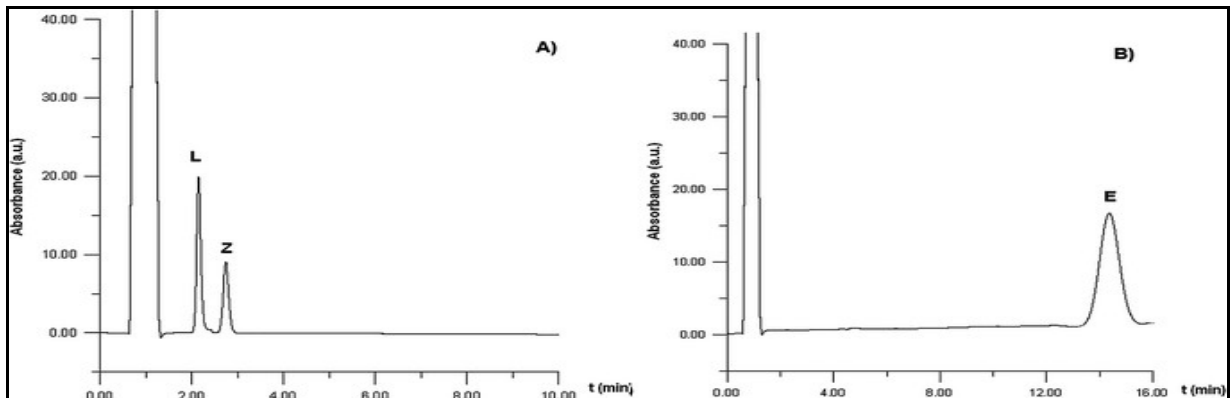
No início da década de 90, foram introduzidas as partículas esféricas de 3 μ m a 3,5 μ m que alcançavam eficiências significativamente maiores que as anteriores, em torno de 22000 pratos/15 cm. Com isso, as análises tornaram-se 30% a 50% mais rápidas e eficiências mais elevadas foram alcançadas porque estas partículas permitem enchimentos mais reprodutíveis e formam um leito cromatográfico mais homogêneo e compacto (Collins, Braga e Bonato,1993).

A seguir, surgiram as partículas esféricas porosas de diâmetro de 2,5 μ m, com as quais são obtidas colunas cromatográficas com altas eficiências, cerca de 25000 pratos/15 cm. Nestas colunas cromatográficas os enchimentos são reprodutíveis e as análises são mais rápidas devido à diminuição dos tamanhos das colunas cromatográficas.

A próxima evolução foi caracterizada pela apresentação das partículas esféricas porosas de diâmetro de 1,7 μ m que, comparadas às partículas de 5 μ m ou 3 μ m, permitem ainda melhores resoluções e altas eficiências em menores tempos de análise, atingindo cerca de 30000 pratos/15 cm. Entretanto, o máximo desempenho cromatográfico dessas partículas foi limitado pela pressão. Para contornar esse obstáculo sistemas capazes de trabalhar em altas pressões (15000psi) foram desenvolvidos, o avanço da cromatografia líquida denominado de cromatografia líquida de ultra eficiência (Maldaner e Jardim, 2009).

A figura 4 – Cromatograma apresenta um gráfico que possibilita avaliar os resultados da análise cromatográfica, resultando na identificação dos componentes na mistura.

Figura 4 – Cromatograma



Fonte: www.biomedicinabrasil.com (2014)

2.3 Colunas cromatográficas na atualidade

Atualmente, a coluna para a cromatografia líquida é um tubo de aço inoxidável, fechado em ambas as extremidades por filtros específicos, com a função de conter e preservar a fase estacionária.

Segundo os fabricantes de colunas cromatográficas, como por exemplo, *ACE*, *GL Sciences Inc.*, *Tecknokroma*, *Varian*, *Waters*, *Merck*, o aço inoxidável é o material mais empregado entre todos os materiais devido à sua resistência mecânica e, devido à selagem das extremidades, a coluna cromatográfica ser capaz de resistir às altas pressões de trabalho, geralmente entre 1.000psi a 5.000psi.

Como citado, os extremos da coluna cromatográfica são fechados por filtros específicos. Estes filtros são, em geral, discos de aço inoxidável, para evitar a perda do material interno da fase estacionária ou mudanças na sua compactação. Estes discos de fechamento, além da função de reter as partículas da fase estacionária, controlam a pressão interna, devido a aplicação da fase móvel.

As dimensões das colunas cromatográficas (diâmetro e comprimento), assim como o tipo de empacotamento (fase estacionária), variam conforme a sua finalidade. Estas características das colunas cromatográficas definem a capacidade de separação, seletividade e eficiência.

O ajuste de polaridade/apolaridade entre a fase móvel e a fase estacionária define a qualidade da análise cromatográfica. Por exemplo, quando a fase estacionária tem natureza apolar (hidrocarbonetos) e a fase móvel é um líquido polar

(água ou álcool), a coluna cromatográfica retém os materiais apolares por mais tempo.

2.4 Descrição de coluna cromatográfica

A Figura 5 apresenta uma variedade de tipos de colunas conforme a classificação da Farmacopeia americana (USP) para colunas cromatográficas. A descrição de uma coluna registra informações sobre o número de carbonos na substância componente da fase estacionária, conforme a classificação USP (2014), além de destacar o grupo funcional e várias formas de nomenclatura.

Figura 5 – Classificação USP para colunas cromatográficas

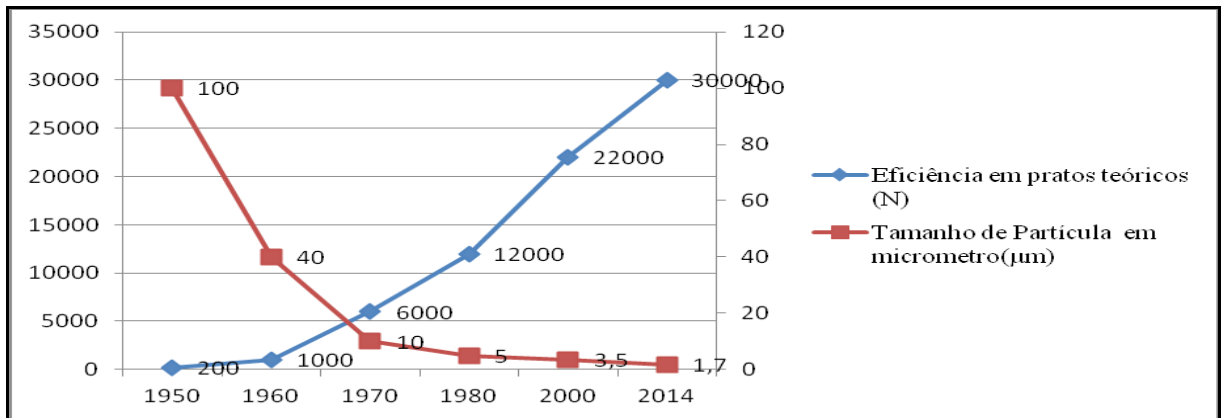
Classificação USP para Colunas Cromatográficas (Colunas mais utilizadas)	
L1	Octadecilsilano ligado a sílica porosa ou micro-partículas cerâmicas de 3 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_{17}-CH_3$ Nomenclatura: C₁₈, RP-18 ou ODS
L3	Partículas de sílica totalmente porosa de 5 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: SiOH Nomenclatura: Si
L7	Octilsilano ligado a sílica totalmente porosa de 3 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_7-CH_3$ Nomenclatura: C₈ ou RP-8
L8	Aminopropilsilano ligado a sílica totalmente porosa de 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-NH_2$ Nomenclatura: NH₂
L9	Sílica totalmente porosa quimicamente ligado a grupos de troca catiônica, ácido forte, partículas de 10µm. Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$ Nomenclatura: SA
L10	Grupo Nitrila ligado a sílica totalmente porosa de 3 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-CN$ Nomenclatura: CN
L11	Grupo Fenil ligado a sílica totalmente porosa de 5 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-\text{C}_6\text{H}_5$ Nomenclatura: C₆H₅ ou Phenyl
L14	Sílica totalmente porosa quimicamente ligado a grupos de troca aniônica, base forte, partículas de 10µm. Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-\text{C}_6\text{H}_4-CH_2-N^+(CH_3)_2Cl^-$ Nomenclatura: SB
L16	Dimetilsilano ligado a sílica totalmente porosa de 5 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_3)_2$ Nomenclatura: C₂
L17	Resina polimérica de troca catiônica constituído de ligações cruzadas de estireno-divinilbenzeno sulfonado na forma de hidrogênio, 7 a 11 µm de diâmetro Grupo Funcional: -SO₃H Nomenclatura: Sugar 810H ou ION300 OA
L19	Resina polimérica de troca catiônica constituído de ligações cruzadas de estireno-divinilbenzeno sulfonado na forma de Cálcio, cerca de 9 µm de diâmetro Grupo Funcional: -SO₃Ca Nomenclatura: Sugar Ca
L20	Dihidroxipropano ligado a sílica totalmente porosa de 5 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-O-CH_2-\underset{\text{OH}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-CH_2$ Nomenclatura: Diol
L26	Butilsilano ligado a sílica totalmente porosa de 5 a 10 µm de diâmetro Grupo Funcional: $-(CH_2)_3-CH_3$ Nomenclatura: C₄

Fonte: Farmacopeia Americana (2014)

2.5 Eficiência da coluna cromatográfica versus tamanho de partícula

O desenvolvimento de novas partículas gerou aumento significativo na eficiência das colunas cromatográficas, como apresentado na Figura 6, onde estão relacionados a eficiência contra o tamanho de partícula.

Figura 6 - Gráfico da eficiência da coluna cromatográfica



Fonte: Elaboração própria

O número de pratos teóricos, N, é o indicativo da eficiência da coluna cromatográfica. Quanto maior for o número de pratos teóricos melhor será a separação da substância analisada.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB, 2010) para picos com formato gaussiano, o número de pratos teóricos por coluna cromatográfica é calculado segundo as expressões:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Sendo:

t = tempo de retenção

W= Larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação

ou

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

t = tempo de retenção

$W_{h/2}$ = Larguras dos picos à meia altura

O valor de N depende da substância a ser analisada e das condições de análise, como fase móvel, temperatura e fase estacionária.

Na prática, o valor de N é obtido no próprio cromatógrafo em uso. O software deste equipamento faz o cálculo a partir da fórmula acima, gerando valores na faixa de 1000 a 30.000 pratos teóricos (FB, 2010).

2.6 Resolução (R)

Ainda segundo a FB (2010), a resolução R é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, sendo calculada segundo a expressão:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad \text{ou} \quad R = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1,h/2} + W_{2,h/2}}$$

Onde:

t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação;

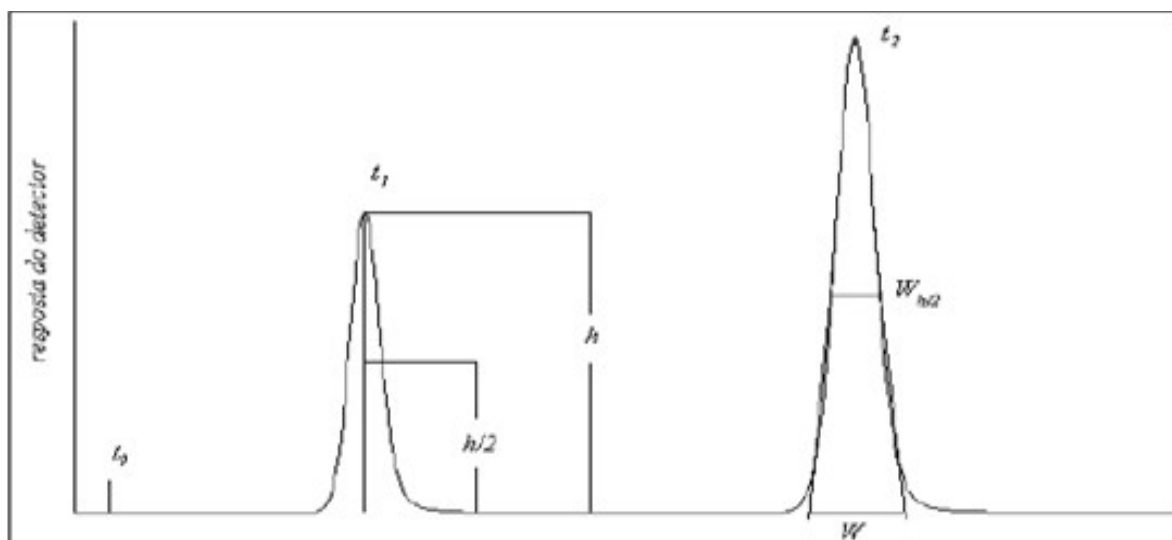
$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

A área ou a altura do pico são, usualmente, proporcionais à quantidade da substância eluída.

O valor da área sob o pico, geralmente, é mais utilizado para o cálculo da Resolução (R). Entretanto o valor desta área pode ser menos preciso caso haja outros picos interferentes.

Para a análise quantitativa, as substâncias devem estar totalmente separadas de qualquer substância interferente, conforme apresentado na Figura 5. Nesta figura estão registrados o pico no tempo do volume morto t_0 e os picos t_2 e t_1 e suas respectivas larguras de base W_1 e W_2 e larguras a meia altura $W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$.

Figura 7 – Separação cromatográfica entre duas substâncias



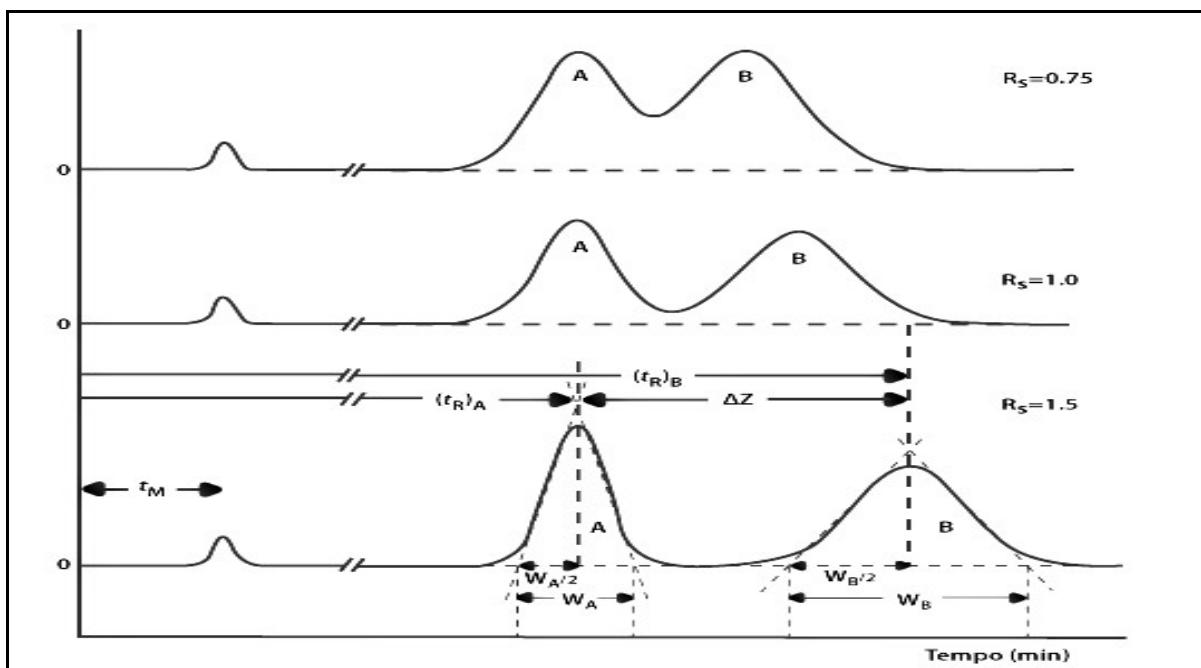
Fonte: Farmacopeia Brasileira (2010)

Para determinar a resolução entre dois picos adjacentes, consideram-se as larguras dos picos W_i na linha de base, bem como os respectivos tempos de retenção t_r , de acordo com a equação acima apresentada.

O valor deste parâmetro reflete o grau de perfeição com que dois picos são separados, considerando a contribuição da eficiência e da seletividade.

O efeito da resolução no grau de separação dos picos pode ser observada na Figura 8 que apresenta três exemplos de resolução, demonstrando resoluções parciais com separação incompleta ($R_s = 0,75$ e $R_s = 1,0$) e uma resolução completa com separação de linha de base ($R_s = 1,5$).

Figura 8 – Representação da resolução R na separação entre dois picos



Fonte: www.biomedicinabrasil.com (2012)

2.7 Fator de cauda (T)

A FB (2010) também apresenta o fator de cauda, T, indicador da simetria do pico. Quando o T apresenta valor igual a 1 o pico é perfeitamente simétrico. Esse valor aumenta à medida que a assimetria do pico fica mais pronunciada. Em alguns casos, são observados valores de T inferiores a 1. Tais valores podem estar associados à não homogeneidade da fase estacionária, à sobrecarga de peso da amostra, à sobrecarga de volume da amostra, ou, ainda, a coeluições.

À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis.

O fator de cauda é calculado segundo a expressão:

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

2 f

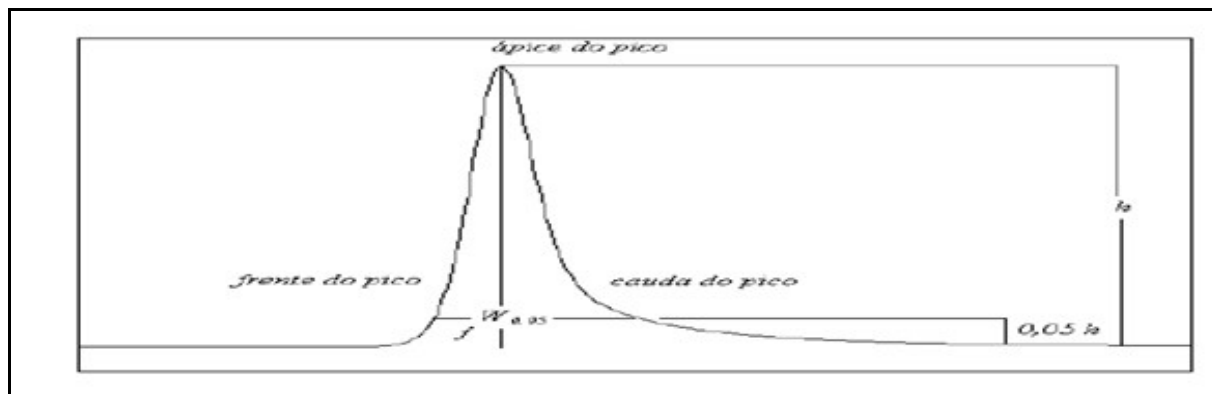
Sendo

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura;

f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura.

A Figura 9 apresenta um pico com detalhamento visual da distorção da simetria.

Figura 9 - Cromatograma com assimetria de pico



Fonte: Farmacopeia Brasileira (2010)

Podem ser citadas várias razões relacionadas à calda do pico, ou seja, fatores que influenciam, negativamente, a assimetria de pico. Entre as várias possíveis razões, podem ser citados o uso de coluna cromatográfica defeituosa, o uso de solvente com força inadequada para a amostra, o tamponamento inadequado da fase móvel, entre outras.

2.8 Adequabilidade do sistema

A FB (2010) ainda apresenta o quesito dos testes de adequabilidade do sistema. Tais quesitos são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida. Estes testes são aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas.

Os principais parâmetros necessários para a verificação da adequabilidade do sistema estão descritos a seguir:

- A resolução, R , é função da eficiência da coluna cromatográfica, N , e é especificada para garantir que as substâncias eluídas proximamente apresentem separação satisfatória, sem interferências mútuas.

- Replicatas de injeções da solução padrão são trabalhadas, estatisticamente, para verificar se os requerimentos para a precisão da análise foram atingidos. A

menos que especificado na monografia individual, são utilizados os dados de cinco réplicas de injeções para calcular o desvio padrão relativo (DPR), caso a especificação seja igual ou inferior a 2,0%. Existem outros compêndios como o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que requer um desvio padrão relativo inferior a 5,0% (Brasil, 2003).

- O fator de cauda, T, é um parâmetro que observa o alargamento do pico, e verifica-se a simetria do pico, que deve ser igual 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria.

Esses testes são realizados após coletar os resultados de replicatas de injeções da solução padrão ou outra solução especificada na monografia individual.

Podem ser necessários certos ajustes nas condições de trabalho para atingir os parâmetros de adequabilidade do sistema. A menos que especificado na monografia individual em farmacopeia oficial, os parâmetros de adequabilidade do sistema são determinados a partir dos dados obtidos com o pico da substância de interesse.

A precisão do sistema, demonstrada por meio de replicadas da solução padrão, deve ser alcançada antes das injeções das soluções amostras.

A adequabilidade do sistema deve ser verificada durante toda a análise cromatográfica, por injeção de solução padrão em intervalos de tempo apropriados.

Quando houver mudança significativa no equipamento ou em um reagente, os testes de adequabilidade do sistema devem ser realizados antes das injeções da amostra.

2.9 Problemas analíticos atribuídos à coluna cromatográfica

Além dos quesitos acima referidos, a FB (2010) também considera os problemas analíticos em uma análise cromatográfica, conforme apresentado a seguir:

1) Alargamento da banda cromatográfica – pode estar associado à não homogeneidade do suporte, à sobrecarga de peso da amostra, ou, ainda, à sobrecarga de volume da amostra.

2) Produção de cauda ou ombro (quebra de pico) – o filtro de entrada da coluna cromatográfica, sujo ou obstruído, pode ocasionar a quebra do pico ou espaços vazios (volume morto).

3) Redução do número de pratos teóricos – ocorre em função do desgaste natural da coluna cromatográfica pelo uso. Algumas monografias especificam um valor mínimo de pratos teóricos que a coluna cromatográfica deve ter para a execução da análise de uma determinada substância. Este quesito deve ser minuciosamente considerado. O processo de desgaste pode ser acompanhado por um controle de uso da coluna cromatográfica. O final do ciclo de vida de uma coluna cromatográfica pode ser quantificado pelo número de pratos teóricos, ou seja, quando os pratos teóricos chegarem a um valor menor que 10% de seu tamanho, o descarte é aconselhável.

2.9.1 Limpeza

A FB (2010) registra que, em colunas cromatográficas de fase reversa o metanol, mesmo puro, é um solvente fraco para a limpeza de material orgânico lipofílico devido à sua alta polaridade. O melhor solvente para a remoção de material orgânico em geral é o tetrahidrofurano (THF) devido a sua grande força de eluição (polaridade média), a sua miscibilidade com todas as fases e à dissolução das mais variadas substâncias em seu meio.

Esse é um exemplo geral de limpeza de coluna cromatográfica, contudo, é válido lembrar que algumas colunas cromatográficas devem ter uma limpeza mais específica, de acordo com a fase móvel e o produto ou matéria-prima que foram usados.

2.9.2 Regeneração

A FB (2010) trata do tópico de regeneração de coluna cromatográfica.

A regeneração é aplicada quando impurezas são adsorvidas irreversivelmente na matriz da coluna cromatográfica, causando mudanças na seletividade da análise e alargamento do pico. Geralmente, a coluna cromatográfica pode ser regenerada com uma limpeza mais profunda usando solventes apropriados.

Como sugestão de solução para a regeneração de coluna cromatográfica de fase reversa (por exemplo: C18, C8, C4, C1, C30, CN ou Phenyl) pode ser citada a passagem de: 20 volumes de água > 20 volumes de acetonitrila > 5 volumes de isopropanol > 20 volumes de heptano > 5 volumes de isopropanol > 20 volumes de acetonitrila. O símbolo ">" indica a polaridade de uma substância em relação à substância anterior e à substância posterior.

Caso a pressão de trabalho esteja elevada, pode-se inverter o sentido da coluna cromatográfica durante todo o processo de regeneração.

É importante ressaltar que, dependendo da gravidade do problema, a regeneração poderá não recuperar a capacidade de separação da coluna cromatográfica. Caso a regeneração não melhore o desempenho da coluna cromatográfica, o problema pode ser uma contaminação irreversível do recheio ou um defeito físico do leito. Nestes casos cabe apenas o descarte da coluna cromatográfica.

2.10 Recomendações e cuidados para o uso de coluna cromatográfica

Na continuidade, a FB (2010) apresenta recomendações e cuidados para o uso de coluna cromatográfica, conforme referenciado a seguir.

1) Antes de efetuar qualquer injeção de amostra é importante verificar a miscibilidade entre a amostra e a fase móvel. A miscibilidade deve ser testada para evitar precipitação devido à interação entre amostra e fase móvel.

2) Deve ser considerado o volume máximo de injeção para a coluna cromatográfica (em mL ou em tempo em minutos).

3) A faixa de pH para a realização do trabalho também deve ser avaliada, devendo estar entre 2 e 8, em coluna cromatográfica à base de sílica. Para a preservação, a coluna cromatográfica não deve ser exposta às variações extremas de pH.

4) O uso de eluentes de trabalho puramente aquosos (concentração > 95% de água) não deve ser feito em coluna cromatográfica de fase reversa com base de sílica convencional. Na necessidade da utilização de eluentes de trabalho puramente aquosos em colunas cromatográficas de fase reversa, devem-se ser utilizadas algumas colunas cromatográficas especiais.

5) As colunas cromatográficas não devem ser armazenadas ou estocadas com soluções tamponadas.

6) Devem ser evitadas as mudanças drásticas de fluxo e composição da fase móvel.

7) Devem ser usados somente os solventes com grau high performance liquide chromatography (HPLC) ou solvente de pureza maior, para evitar a contaminação da coluna cromatográfica e interferência nos resultados das análises.

8) A fase móvel deve ser filtrada por membranas de porosidade $\leq 0,45 \mu\text{m}$, sob vácuo e desgaseificada por 15 minutos em banho ultrassom. Este procedimento possibilita a remoção de partículas sólidas que podem riscar o pistão ou a válvula injetora ou mesmo entupir os tubos do sistema, diminuir a possibilidade de bolhas no sistema.

9) A concentração do tampão deve ser mantida dentro dos valores mínimos necessários (ex.: 10 mM em vez de 100 mM). Alguns tampões como amônia (acetato, formiato) e aminas (triethylamina, piperidina) são menos agressivos. Os tampões mais agressivos são as soluções de fosfato e de borato.

10) A coluna cromatográfica não deve ser estocada em água, pois pode desencadear a contaminação por crescimento de fungos e reduzir a sua vida útil.

Com todos esses cuidados, as colunas cromatográficas podem ser utilizadas por longo período, mantendo sua eficiência na análise cromatográfica.

2.11 Estocagem

Segundo a FB (2010) para curtos períodos de estocagem, como por exemplo, por uma noite, a coluna cromatográfica pode ser estocada com o eluente usado na última análise. Caso seja tampão, a concentração desta solução deve ser substituída pela mesma proporção de água.

Para longos períodos de estocagem as colunas cromatográficas de sílicas necessitam de solventes apróticos. A concentração de água deve ser no máximo 10%. O melhor solvente de estocagem é a acetonitrila.

Os solventes apróticos, assim como solventes próticos, são bons para dissolver íons, mas carecem de hidrogênio ácido. Estes solventes geralmente têm altas constantes dielétricas e altas polaridades. São exemplos comuns de solventes

apróticos a acetonitrila (CH₃CN), o sulfóxido de dimetila (DMSO), a dimetilformamida (DMF) e a hexametilfosforotriamida (HMPA). São exemplos comuns de solventes próticos a água, a amônia, os álcoois, os ácidos carboxílicos, as amidas primárias, entre outras substâncias.

2.12 Ativação de coluna cromatográfica nova ou armazenada por longo período

Segundo a FB (2010) primeiramente deve ser verificado em qual(is) solvente(s) foi estocada a coluna cromatográfica e quais foram os solventes do teste de eficiência. Com estas informações, pode ser iniciada a ativação com esses mesmos solventes, com aumento gradativo do fluxo e da quantidade de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) até 100%.

Em geral, o tempo e fluxo do solvente orgânico puro a ser usado depende da dimensão da coluna cromatográfica, ou seja (comprimento x diâmetro), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Ativação de coluna cromatográfica

Medidas de coluna cromatográfica comprimento versus diâmetro interno (mm)	Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)
100, 125, 150 x 4.0, 4.6	30	1
250, 300 x 4.0, 4.6	60	1

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010).

Algumas colunas cromatográficas demandam uma ativação específica, sendo responsabilidade do analista a obtenção das informações corretas, apresentadas no folheto de Instruções que acompanha cada coluna cromatográfica.

2.13 Uso de colunas cromatográficas

2.12.1 Registro de controle de estoque de colunas cromatográficas

A FB (2010) também descreve o controle de estoque de colunas cromatográficas.

Dentro de um laboratório analítico, seja de controle de qualidade ou de pesquisa, deve ser mantido o cadastro de dados de cada coluna cromatográfica. Neste cadastro devem estar registradas as informações de número de entrada (número a ser afixado na caixa da própria coluna cromatográfica), do empacotamento, do tamanho, da marca, do fabricante, do lote, do número de série e da data de entrada.

Após o cadastro, a coluna cromatográfica deve ser armazenada, de forma segregada, conforme a classificação da fase estacionária e do tamanho.

Exemplo: C18 250mm x 4,6mm ou C8 150mm x 3,9mm.

2.13.1 Registro de uso de colunas cromatográficas

Quando necessário, uma coluna cromatográfica em estoque é disponibilizada para uso. Para isso é dado baixa no Registro de controle de coluna cromatográfica, especificando a data de saída e o produto, matéria prima ou pesquisa ao qual a coluna cromatográfica está sendo dedicada.

Quando em uso diário, as colunas cromatográficas são etiquetadas “em uso”, por uma etiqueta simples posicionada na própria coluna cromatográfica.

Normalmente, uma coluna cromatográfica é dedicada a certo produto, a certa matéria-prima ou a determinada pesquisa.

Quando a coluna cromatográfica é colocada para uso, deve receber um código, de número sequencial, para a sua identificação, conforme exemplificado a seguir.

Uma coluna cromatográfica destinada ao Controle da Produção deve receber um código que cite o uso previsto, por exemplo, o código CQ-COL-PRO N° “X” indica a coluna cromatográfica em uso no “CQ” (controle de qualidade) e em etapa de “PRO” (produção).

Uma coluna cromatográfica destinada ao Estudo de Estabilidade pode receber o código CQ-COL-EST N° “Y”; indicando a coluna cromatográfica em uso no “CQ” e na “EST” (estabilidade).

O código implantado deve ser registrado em uma etiqueta a ser fixada na coluna cromatográfica.

O código implantado deve ser registrado em documento específico, onde serão detalhados todos os usos e procedimentos (limpeza, regeneração, etc.) da coluna cromatográfica em foco. Este documento deve ser preenchido continuamente e ser conferido pelo profissional responsável pelo laboratório analítico.

As colunas cromatográficas em uso devem ser guardadas limpas em caixas numeradas e em armário dedicado.

A dedicação de uma determinada coluna cromatográfica para um determinado processo analítico, além de facilitar o manuseio da mesma para análise, aumenta a sua vida útil.

2.13.2 Ficha de registro de uso da coluna cromatográfica

O Quadro 1 apresenta o registro de uso da coluna cromatográfica e exibe todos os dados referentes às características da coluna, (empacotamento, tamanho da coluna cromatográfica, tamanho de partícula, código da coluna cromatográfica, número de série, PART NUMBER (referência), número do lote, fabricante e marca), necessários ao registro de uso de uma coluna cromatográfica.

Todos esses dados devem estar preenchidos antes do início de uso da coluna cromatográfica.

REGISTRO DE USO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA		
Empacotamento C8	Tamanho 250 mm X 4.6 mm	Tamanho da Partícula 5 µm
Código CQ-COL-PRO N°200	Número de Série 237865234	Referência (Part Number) 818956
Número do Lote FC075458	Fabricante MERCK	Marca NOVA PACK

Data	Objetivo Uso	Produto	Dosagem (Matéria Prima ou Produto)	Fluxo (mL/min)	Pressão (psi/bar)	Tempo Retenção (min)	Pratos Teóricos	Número Injeções	Equipamento	Resposta para Análise

Fonte: Elaboração própria

2.13.3 Ficha de registro de limpeza de coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas também devem apresentar os dados referentes as suas características, (empacotamento, tamanho da coluna cromatográfica, tamanho de partícula, código da coluna cromatográfica, número de série, Part Number (referência), número do lote, fabricante e marca) (FB, 2010)

Cada limpeza específica, realizada na coluna cromatográfica, deve ser registrada no campo de observação.

Quadro 2 – Registro de limpeza de colunas cromatográficas

REGISTRO DE LIMPEZA DE COLUNA CROMATOGRÁFICA

Empacotamento C8	Tamanho 250 mm x 4.6 mm	Tamanho da Partícula 5 µm
Código CQ-COL-PRO N°200	Número de Série 237865234	Referência (Part Number) 818956
Número do Lote FC075458	Fabricante MERCK	Marca NOVA PACK

Data	Motivo da Lavagem	CAN / H2O/ MeOH	Fluxo (mL/min)	Pressão (psi/bar)	Tempo Retenção (min)	Pratos Teóricos Número	Número Injeções	Equipamento

Fonte: Elaboração própria

3. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida é uma técnica bastante antiga, com mais que 100 anos de existência. Vem sendo utilizada, sem interrupção, em análises de rotina em diversas áreas, como, por exemplo, na indústria química, na indústria farmacêutica, pesquisa, entre outros e, ainda com difusão sempre crescente.

Esta ampla difusão está relacionada principalmente à disponibilidade da instrumentação desenvolvida e adequada para as necessidades das rotinas analíticas.

As colunas cromatográficas modernas, parte essencial da técnica cromatográfica, são o resultado de anos de pesquisa em busca de fases estacionárias que permitam a separação de misturas complexas com seletividade, eficiência, resolução e rapidez. Para isso, foi necessário o desenvolvimento de novas colunas cromatográficas e/ou o melhoramento das colunas cromatográficas já existentes, o desenvolvimento de novas estratégias no preparo de fase estacionária e também, a criação de novas fases com diferentes funcionalidades.

Com base nos desenvolvimentos recentes, não resta dúvida que as análises realizadas, utilizando-se diferentes fases estacionárias, são muito mais rápidas, o consumo de solventes é bem menor, as eficiências alcançadas são mais elevadas, e a detectabilidade é de múltiplas vezes maior, quando comparadas as análises antigas.

Este estudo pode confirmar a importância da evolução da técnica de cromatografia líquida, e, ao mesmo tempo, da evolução das colunas cromatográficas, devido à otimização de tempo de análise, da capacidade de seletividade, da eficiência da metodologia, precisão de resultados e baixo consumo de solventes, permitindo a identificação e/ou a quantificação dos compostos presentes com confiabilidade e baixo custo operacional.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira 5º Edição**. Brasília, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

Estados Unidos da America. Organização Independente, Científica e Sem Fins Lucrativos. **Farmacopeia Americana 37º Edição**. Washington. 2014.

ETTRE, L. S. M.S. Tswett and the invention of chromatography. **LCGC North America**. v.21, 2003. Disponível em <<http://www.connection.ebscohost.com>>. Acesso em: Oct. 10 2015.

F. Juliano, Valmir. Introdução aos Métodos Cromatográficos.Valmir F.Juliano. 2015. <<http://www.profvalmirfjuliano>>. 21/Set/2015.

NICÉSIO, R. G. Métodos Cromatográficos. Raphael Gonçalves Nicésio. 2012. Disponível em <<http://www.biomedicinabrasil.com>>. 22 Jul. 2015.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Quim.nova. 32 (1), 2009.

COLLINS, S.H.I. MICHAEL Tswet e o nascimento da cromatografia. Scientia chromatographics 1 (1), 2009.