



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Raquel Rebelo Paulino

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações” referentes à unidade “Estágio”, sob orientação da Dra. Juliana Pratas, da Dra. Joana Ramos e do Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Raquel Rebelo Paulino

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações” referentes à unidade “Estágio”, sob orientação da Dra. Juliana Pratas, da Dra. Joana Ramos e do Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Raquel Rebelo Paulino, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2014203652, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de setembro de 2020.

(Raquel Rebelo Paulino)

Agradecimentos

À minha mãe e ao meu pai, a quem devo o meu maior agradecimento, não chegando as palavras para o descrever, por serem os meus grandes pilares, lutaram ao meu lado, apoiaram-me e nunca me deixaram ir abaixo.

Ao meu irmão que esteve sempre presente, acompanhou-me e deu-me força, tendo eu lutando sempre para ser um exemplo de irmã para ele.

Aos meus avós maternos, por me apoiarem, por se lembrarem sempre de mim e especialmente por me darem sempre valor.

Ao meu avô paterno, um agradecimento especial, mesmo não estando presente fisicamente no final do meu percurso, realizou quase toda a caminhada comigo. “Deixou-me” pouco antes de terminar o curso, mas mesmo assim, deixou-me muito feliz porque ainda me viu de “bata branca”, fiz-lhe um atendimento ao balcão pouco antes de partir e ele disse-me que estava orgulhoso e muito feliz de me ver assim.

À minha madrinha “Mimi” que esteve sempre presente nos momentos importantes, transmitindo-me sempre alegria e coragem.

A todos os meus familiares e amigos que de uma ou outra forma contribuíram para a minha formação.

A toda a equipa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por me proporcionar esta formação tão completa, sempre com apoio e dedicação de todos.

Ao Professor Doutor Ricardo Castro por todo o trabalho e tempo que dedicou, por toda a simpatia, calma e coragem que me transmitiu.

À Margarida, Rita e Rute, amigas deste grande percurso que levo para a vida, viveram comigo os momentos altos e ajudaram-me a ultrapassarem os baixos.

A toda a equipa da Farmácia São Tomé por todo o conhecimento que me fizeram chegar, por todo o apoio e acolhimento que me deram, bem como pela confiança que depositaram em mim. Agradeço ainda, todos os momentos de trabalho em equipa e a grande amizade.

A toda a equipa do departamento do Controlo de Qualidade pela oportunidade e ajuda que me deram.

Obrigado pela ajuda!

ÍNDICE

Capítulo I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	7
Resumo	8
Abstract	8
1. Introdução.....	9
2. O Estágio - Farmácia São Tomé.....	9
2.1 Atividades do Estágio	10
3. Análise SWOT	11
3.1 Pontos Fortes.....	11
3.1.1 Equipa técnica	11
3.1.2 Robot e Caixa automática.....	11
3.1.3 Utentes da FST	11
3.2 Pontos Fracos	12
3.2.1 Receitas Manuais.....	12
3.2.2 Associação entre DCI e o nome comercial.....	12
3.3 Oportunidades.....	12
3.3.1 Participação em formações.....	12
3.3.2 Medicamentos e produtos de uso veterinários	13
3.4 Ameaças	13
3.4.1 Pandemia e a determinação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos	13
3.4.2 Medicamentos esgotados.....	13
3.4.3 Alterações nas embalagens dos medicamentos	14
4. Casos Práticos.....	14
4.1 Caso 1.....	14
4.2 Caso 2.....	15
5. Considerações Finais	16
6. Bibliografia.....	17
7. Anexo.....	18

Capítulo II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas.....	20
Resumo	21
Abstract	21
1. Introdução.....	22
2. O Estágio - Laboratórios Basi.....	22
2.1 Atividades do Estágio	23
3. Análise SWOT	24
3.1 Pontos Fortes.....	24
3.1.1 Segurança em tempo de pandemia	24
3.1.2 Departamento Multidisciplinar	24
3.2 Pontos Fracos	25
3.2.1 Falta de Comunicação.....	25
3.2.2 Inúmeros Registos	25
3.3 Oportunidades.....	26

3.3.1	Novas Perspetivas.....	26
3.3.2	Aquisição de competências ao nível informático.....	26
3.3.3	Auditorias Internas/Externas.....	26
3.4	Ameaças	27
3.4.1	Lacunas na formação académica.....	27
3.4.2	Subvalorização do farmacêutico	27
4.	Considerações Finais	28
5.	Bibliografia.....	29

Capítulo III - Monografia “ Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações”

Abreviaturas.....	31
Resumo	32
Abstract	33
1. Introdução.....	34
2. Parâmetros Cromatográficos	35
2.1 Fator de retenção (k).....	36
2.2 Seletividade (α).....	36
2.3 Eficiência da Coluna.....	37
2.3.1 Teoria dos pratos teórico	37
2.3.2 Equação de Van Deemter	37
2.4 Resolução (R_s).....	39
3. Cromatografia Líquida.....	40
3.1 Tipos de Cromatografia Líquida	41
4. HPLC.....	44
5. UHPLC.....	45
6. Componentes do sistema.....	45
6.1 Reservatório de solventes/ Mistura de solventes	46
6.2 Bomba.....	47
6.3 Injetor	48
6.4 Coluna	49
6.5 Detetor.....	50
7. UHPLC vs HPLC.....	53
8. Exemplo real das vantagens ao mudar de HPLC para UHPLC:.....	55
9. Empresas/ Equipamentos de referência para UHPLC.....	55
9.1 Waters.....	55
9.2 Thermo Fisher Scientific.....	61
9.3 Agilent.....	63
10. Conclusão.....	66
11. Bibliografia.....	67
12. Anexos.....	71

CAPÍTULO I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA **COMUNITÁRIA**

Farmácia São Tomé

Orientado pela Dra. Juliana Pratas

ABREVIATURAS

DCI	Designação comum internacional
FST	Farmácia São Tomé
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
SWOT	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Treats</i>

RESUMO

O estágio curricular em Farmácia Comunitária é o momento de contactar com a atividade profissional e pôr em prática todo o conhecimento obtido ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica (MICF).

Foi na Farmácia São Tomé (FST), em Condeixa-a-Nova, que tive o primeiro contacto com a prática profissional e onde apliquei muita da aprendizagem adquirida durante o MICF.

Através do estágio mencionado e com o apoio de toda a equipa, adquiri novas competências, descobri aptidões e cresci tanto ao nível profissional como pessoal.

No presente relatório, disposto sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weakness, Opportunities e Threats*), são mencionados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que experienciei ao longo do estágio.

Palavras-chave: Análise SWOT, Estágio, Farmácia Comunitária.

ABSTRACT

The curricular internship in Community Pharmacy is the time to contact professional activity and put into practice all the knowledge obtained throughout the Integrated Master in Pharmaceutical Sciences (MICF).

It was at the São Tomé Pharmacy (FST), in Condeixa-a-Nova, that I had my first contact with professional practice and where I applied much of the learning acquired during the MICF.

Through the internship mentioned and with the support of the entire team, I acquired new skills, discovered skills and grew them both professionally and personally.

This report, provided in the form of SWOT analysis, the strengths, weaknesses, opportunities and threats that I experienced throughout the internship.

Keywords: SWOT Analysis, Internship, Community Pharmacy.

I. INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) tem uma duração de 5 anos, em que os 4 primeiros anos têm uma componente fortemente teórica. O último semestre do curso é constituído pela disciplina “estágio curricular”, etapa fundamental, em que nos é facultada a possibilidade de realização de um estágio em Farmácia Comunitária. É nessa altura que pomos em prática o conhecimento adquirido ao longo desses anos, e que contactamos diretamente com a atividade profissional.

O farmacêutico comunitário tem um papel extremamente ativo na sociedade, podendo este “contribuir em áreas como a gestão da terapêutica, administração de medicamentos, determinação de parâmetros, identificação de pessoas em risco, deteção precoce de diversas doenças e promoção de estilos de vida mais saudáveis.” [1] Para além de ter um papel extremamente ativo na sociedade, também ocupa uma posição privilegiada no Sistema Nacional de Saúde pois as farmácias comunitárias podem representar tanto o primeiro como o último contacto dos utentes com os serviços de saúde.

O presente relatório relata o estágio realizado na Farmácia São Tomé, sob orientação da Dra. Juliana Pratas, destacando a importância do estágio em Farmácia Comunitária para o meu crescimento tanto ao nível profissional como pessoal.

O relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT fazendo uma avaliação do estágio curricular tanto numa perspetiva interna como externa. Ao nível interno são avaliados os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*), ao nível externo são avaliadas as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) que experienciei durante o estágio, bem como uma integração da aprendizagem teórica na prática profissional e a adequação do MICF para as perspetivas profissionais futuras.

2. O ESTÁGIO - FARMÁCIA SÃO TOMÉ

O estágio que efetuei foi realizado na Farmácia São Tomé situada em Condeixa-a-Nova, mais especificamente na Urbanização Quinta de São Tomé, próxima de espaços de lazer bem como de espaços de saúde.

Este estágio não ocorreu exatamente como o planeado, uma vez que, devido ao aparecimento da COVID-19 ocorreram interrupções. O primeiro mês ocorreu normalmente, de seguida, devido aos relatos dos meios sociais acerca do vírus e de esta já estar em Portugal, foi uma azáfama na farmácia. Muitas pessoas ficaram assustadas, começaram a pensar que os

medicamentos iam escassear, quiseram abastecer as “farmácias de casa”, prevenir-se para o que viesse e a afluência a esta aumentou.

Quando o número de pessoas infetadas pelo coronavírus aumentou em Portugal foram impostas medidas de segurança, nomeadamente na FST. A afluência à farmácia diminuiu devido ao receio de infeção e a equipa foi dividida em dois turnos, fazendo eu parte de um, para não nos cruzarmos caso houvesse contágio. O estado de emergência foi, entretanto, decretado, sendo-me aconselhado ir para casa. Quando o estado de emergência foi retirado a Indústria Farmacêutica contactou-me, pelo que fui realizar o estágio em Indústria Farmacêutica. Após termino desse, regressei à Farmácia Comunitária para findar o estágio anteriormente iniciado.

2.1 ATIVIDADES DO ESTÁGIO

Inicialmente, realizei atividades de *back-office*, como a arrumação de medicamento e a sua colocação no *robot* para me familiarizar com a sua localização e com o seu nome de marca, que posteriormente me foi útil no atendimento ao balcão. Um pouco depois, comecei a dar entrada de algumas encomendas e a assistir a alguns atendimentos ao balcão, para me adaptar ao sistema Sifarma2000® e acompanhar algumas situações do aconselhamento farmacêutico.

Seguidamente, iniciei o atendimento ao balcão, etapa exigente, mas muito gratificante. Em simultâneo, realizei a determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, assisti ao fecho do mês com a verificação de todo o receituário, conferi *stocks* e validades. Também ao balcão, recebi várias embalagens vazias e de medicamentos fora de uso ou de prazo que coloquei no contentor VALORMED, a VALORMED é uma sociedade sem fins lucrativos responsável pela gestão dos resíduos de embalagens e medicamentos fora de uso [2].

No final do estágio, em agosto, fiz um pouco de tudo para me reavivar de alguns pormenores. Fiz ainda, a reserva de um grande número de pedidos para a vacina da gripe, prevendo-se que o número de adesão este ano seja muito superior. Mais uma vez, realça-se a intervenção fundamental do farmacêutico dado que os cidadãos cada vez mais preferem ser vacinados na farmácia, devido ao menor tempo de espera e à grande confiança que têm no farmacêutico, bem visível na FST [1].

3. ANÁLISE SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta útil que de forma crítica e esquemática expõe várias questões, internas e externas que influenciaram positiva e negativamente a minha aprendizagem, bem como uma integração desta na prática profissional e a adequação do MICF para as perspetivas profissionais futuras.

3.1 PONTOS FORTES

3.1.1 Equipa técnica

A equipa técnica da FST (Anexo A) constituiu um ponto fulcral no meu processo de aprendizagem. Esta equipa possui um vasto conhecimento técnico-científico, é dinâmica e proativa. Movida por um grande espírito de equipa, simpatia e boa disposição, enquadrando-me desde logo na equipa.

Desde o início todos os membros da equipa se mostraram disponíveis para me esclarecer quaisquer dúvidas, motivando-me sempre ao longo de todo o processo e confiando em mim, permitindo-me assim obter um ótimo aproveitamento e crescimento.

3.1.2 Robot e Caixa automática

A FST possui nas suas instalações um *robot* e uma caixa automática, ambos uma mais-valia para o funcionamento da mesma. A caixa automática permite uma diminuição dos eventuais erros humanos que poderiam existir na realização dos trocos, bem como num controlo rigoroso da entrada e saída de dinheiro. Já o *robot* facilita o armazenamento de medicamentos poupando muitas horas de trabalho, para além disso efetua a entrega dos medicamentos ao balcão, o que faz com que não seja necessário afastarmo-nos do mesmo, permitindo uma maior proximidade com o utente para poder esclarecer eventuais dúvidas.

3.1.3 Utentes da FST

O foco da FST são os utentes, trabalhando com o intuito de satisfazer as suas necessidades com o máximo contentamento.

A FST é solicitada por uma grande heterogeneidade de utentes. Esta variabilidade de utentes proporcionou-me uma grande vantagem, uma vez que exige uma adequação constante às diversas situações, nomeadamente ao nível do discurso.

De entre os utentes da FST uma parte considerável são os utentes fidelizados. Quando um utente é utente frequente da farmácia, a FST cria uma ficha no sistema Sifarma2000® com os dados do utente preenchidos. Estes dados permitem fazer um atendimento mais

personalizado proporcionando uma maior confiança ao utente, esta confiança permite estabelecer uma ligação mais próxima fundamental para aumentar a minha confiança no atendimento ao balcão. Estes utentes permitem ainda uma gestão mais acertada do stock, visto que as suas aquisições são mas previsíveis.

3.2 PONTOS FRACOS

3.2.1 Receitas Manuais

Atualmente as receitas são prescritas por via eletrónica. As prescrições por via manual estão a ser eliminadas com o objetivo de se obterem ganhos de eficiência. Estas prescrições (por via manual) ocorrem excecionalmente nos casos mencionados na Portaria nº 390/2019 de 29 de outubro [3].

Para que o farmacêutico possa dispensar os medicamentos mencionados numa receita manual, vários elementos têm que ser confirmados. Elementos estes como: o prazo de validade da receita, o nome e número de utente, a entidade, a assinatura do prescriptor e a vinheta, bem como a justificação para a prescrição da receita manual.

Durante o atendimento foi com a presença destas receitas que me senti mais insegura, uma vez que demorava algum tempo a analisar a presença de todos os elementos e nem sempre era perceptível a caligrafia do prescriptor.

3.2.2 Associação entre DCI e o nome comercial

Fazer a associação entre o nome comercial do medicamento de marca e a designação comum internacional (DCI) foi uma das dificuldades que senti durante o estágio, nomeadamente no atendimento ao balcão.

Nas receitas eletrónicas a maioria das prescrições de medicamentos sujeitos a receita médica é feita por DCI, mas o utente na maioria das vezes solícita o medicamento pelo nome comercial, tornando-se assim uma barreira na comunicação. No entanto no decorrer do estágio, através do contacto com as embalagens, tanto na arrumação dos medicamentos como na receção dos mesmos, fui tendo conhecimento de alguns dos nomes comerciais ajudando-me a atravessar esta barreira.

3.3 OPORTUNIDADES

3.3.1 Participação em formações

O farmacêutico como profissional e agente de saúde pública, deve procurar manter-se sempre atualizado.

No período inicial do estágio tive a oportunidade de assistir a várias formações, realizadas na FST por delegados de informação médica e farmacêutica. Assisti a formações da Rene Furterer[®], Pharma Nord (Bioativo[®] Glucosamina & Condroitina), Bayer (Canesten Unidia[®] e Bepanthen Baby[®]), apenas assisti a formações no início do estágio, uma vez que estas foram suspensas com o aparecimento da pandemia (COVID-19). No entanto considero estas formações essenciais, pois permitiram-me conhecer muito melhor os produtos ganhando confiança para os poder aconselhar no atendimento.

3.3.2 Medicamentos e produtos de uso veterinários

Na FST existe uma vasta procura de medicamentos e produtos de uso veterinário, sendo esta composta por um grande leque de soluções.

Está incluído no MICF a unidade curricular de Preparações de Uso Veterinário, unidade esta que me ajudou a ter algumas noções básicas sobre o tema, com a introdução de conceitos básicos, de grande importância, porém têm pouca aplicabilidade na prática.

No entanto, o MICF proporciona-nos a escolha de uma disciplina opcional, tendo sido a minha escolha Gestão de Informação em Saúde. Aí, foi-me possível aprender sobre as principais doenças, bem como a reprodução dos animais de companhia. Aprendi ainda sobre a desparasitação, tendo contacto ao vivo com os vários desparasitantes, e as principais intoxicações nos animais de companhia. Através desta unidade curricular senti-me motivada e mais à vontade para efetuar aconselhamento farmacêutico na área da veterinária.

3.4 AMEAÇAS

3.4.1 Pandemia e a determinação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos

Com o surgimento da COVID-19 houve uma redução na procura para a determinação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e, com o estado de emergência decretado, estes serviços foram suspensos bem como outros serviços disponíveis na FST, tais como, as consultas de nutrição e podologia. Por conseguinte, realizei menos determinações dos parâmetros do que desejava, o que fez com que não me sentisse tão segura na sua determinação e que não pudesse acompanhar o utente tão de perto.

3.4.2 Medicamentos esgotados

Medicamentos esgotados sempre foi um problema geral pois, o circuito do medicamento é complexo, podendo estes estar esgotados nos armazenistas ou mesmo nos laboratórios. E, com o surgimento das notícias da COVID-19 houve um aumento da afluência

às farmácias, ocorrendo um aumento de medicamentos esgotados. Na FST houve um enorme controlo para que não ocorressem falhas no *stock*, para que toda a população pudesse ter acesso aos medicamentos que necessitava.

Ao balcão esta situação é complicada porque o utente precisa do medicamento para a sua saúde, mas, a equipa da FST procura sempre uma alternativa. Existe a possibilidade de o substituir por um genérico ou por um do mesmo grupo homogéneo, podendo ainda averiguar a disponibilidade em outras farmácias do meio envolvente. No entanto, explicar esta situação, especialmente a idosos, nem sempre é fácil pois muitas vezes não compreendem a situação, atribuindo a culpa à farmácia ou mesmo a quem o está a atender.

3.4.3 Alterações nas embalagens dos medicamentos

Por vezes, ocorrem alterações nas embalagens dos medicamentos, uma das alterações que ocorreu durante o meu período de estágio foi a embalagem do Eutirox[®]. Neste medicamento, a lactose foi retirada e foram introduzidos os excipientes manitol e ácido cítrico para melhorar a estabilidade do fármaco, não estando implicadas alterações da dosagem ou do regime de toma [4].

Esta nova embalagem alterou o tom da risca e assumiu uma borboleta, alterações mais que suficientes para que quando mostrava a embalagem ao utente, ele me dizia logo que não era aquele que tomava, ou que a dose não deveria ser aquela. Por vezes, tinha mesmo que pedir ajuda a algum colega, que o utente confiasse, para explicar que a embalagem tinha mudado, uma vez que sendo eu nova o utente tinha medo que estivesse enganada.

4. CASOS PRÁTICOS

4.1 CASO I

MC, uma senhora com cerca de 65 anos, dirige-se à farmácia queixando-se que andava com tosse à mais de uma semana. Disse-me também que andava a tomar Bissoltussin[®], uma vez que tinha em casa porque o médico lhe tinha recomendado da última vez que tinha tido tosse, mas, que não andava a sentir melhorias nenhuma.

Questionei se tinha mais algum sintoma como febre ou nariz entupido, ao qual me respondeu que não, era só mesmo a tosse que já andava a incomodar. Perguntei então se a tosse era seca ou sentia expetoração, a senhora respondeu-me que quando tossia parecia que tinha alguma coisa colada e alguma expetoração. De seguida, averigui se tinha asma ou algum problema gástrico, ao qual percebi que não.

Comecei por lhe explicar que o Bissoltussin[®] está indicado para uma tosse seca, irritativa, o que talvez não ajudasse a libertar o que sentia. Aconselhei-lhe um expetorante mucolítico, Fluimucil[®] (acetilcisteína), explicando que são comprimidos que se dissolvem na água e que iriam diminuir a viscosidade do muco, podendo induzir alguma tosse para libertar as secreções. Para além destes comprimidos, deveria beber muita água para ajudar a fluidificar e a libertar o que sentia colado na garganta e a expetoração.

4.2 CASO 2

JR, uma senhora com cerca de 30 anos, dirige-se à farmácia muito aflita porque tem o seu cão cheio de pulgas, um cão que mora dentro de casa. Disse-me que só tem esse animal, e o cão, sempre que vai à rua vem para casa, cheio de pulgas. Perguntei-lhe se costuma desparasitar o cão, ao qual me responde que sim, disse-me que administra Advantix[®] de 4 em 4 semanas e que não fazia efeito.

Com um pouco mais de conversa, disse-me que sempre que o cão vai à rua dá-lhe banho porque não pode ir sujo para os tapetes. Aí percebi o porquê do Advantix[®] não estar a fazer efeito. Expliquei-lhe que se dá banho ao animal, dois dias antes ou dois dias depois da administração da pipeta o efeito vai ser reduzido ou mesmo anulado, não fazendo assim o efeito matar e repelir as pulgas. Questionou-me então o que deveria fazer porque, para além do cão estar cheio de pulgas, a casa também já deveria ter.

Comecei então por lhe explicar o que deveria fazer ao cão, disse-lhe que lhe deveria dar banho com um champô indicado para matar as pulgas, e que o cão não deveria sair de casa nos dois dias seguintes. Ao fim desses dois dias deveria aplicar a pipeta (Advantix[®]) e uma coleira repelente (Scalibor[®] ou Seresto[®]) e, quando o cão for à rua e regressar para casa deveria apenas limpá-lo com um toalhete, só mais na zona das patas que é o que se suja, se der banho o efeito dos repletos será comprometido.

Para além do animal, expliquei-lhe que tinha que fazer em simultâneo um controlo ambiental, ou seja, lavar tapetes e mantas/ aspirar e usar Bolfo Casa[®], que é um inseticida para ser aplicado em casa nos locais onde se possam encontrar as pulgas, os seus ovos e larvas de forma a não haver nova infestação.

Por fim disse-lhe resumidamente que deve: lavar o cão com o champô que lhe indiquei, fazer o controlo ambiental e, passados dois dias, aplicar uma ampola e uma coleira repelente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais uma etapa terminada, etapa fundamental para pôr em prática todos os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF e adquirir muitos outros.

Através deste estágio tive contacto com toda a dinâmica de uma farmácia, com todo o circuito do medicamento ou produto de saúde desde a sua chegada, através do armazenista, até a sua dispensa ao utente.

Integrei uma equipa fantástica na FST que me transmitiu mais conhecimentos, ajudou-me a consolidar os que já tinha, apoiou-me e fez-me crescer, realçando sempre o valor do farmacêutico.

Um facto importante que notei ao longo do estágio foi que, o tipo de medicamentos e produtos dispensados ao longo do tempo variam muito com a época do ano. No início do estágio, inverno, foram dispensados sobretudo analgésicos, anti-inflamatório e descongestionantes, depois, a meio do estágio, que era altura de primavera mais anti-histamínicos e xaropes para a tosse, na última parte do estágio, com verão e as férias, muitos protetores solares e produtos repelentes foram dispensados. Este facto, permitiu-me aprofundar conhecimentos diferentes ao longo do estágio conseguindo assim fazer melhores aconselhamentos.

A interação com a grande diversidade de utentes, uns mais compreensivos, outros mais difíceis e algumas situações mais desconfortáveis, tornam a profissão farmacêutica tão importante e desafiadora. Este estágio realizou-se durante uma situação de pandemia, em que, a equipa da FST teve que se unir, onde eu fui enquadrada, e ganhar forças. Devido ao período que vivemos foi necessário transmitir muita calma, coragem e algum apoio aos utentes. Notei que muitos dos utentes se dirigiam à farmácia para se munir de algum força e conforto.

Terminei esta etapa com um balanço muito positivo que considerado que foi fundamental no meu percurso, tanto ao nível profissional como pessoal. Apesar de tudo, considero que vi muito, aprendi muito e sobretudo cresci muito, guardando sempre o valor do farmacêutico no meu coração.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 12-08-2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. VALORMED - **Quem somos**. [Acedido a 03-09-2020]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA N° 208/2019, Série I - Portaria n.º 390/2019 de 29 de outubro. 2019.
4. SOCIEDADE PORTUGUESA DE ENDOCRINOLOGIA DIABETES E METABOLISMO (SPEDM) - **Nova fórmula da marca EUTIROX™**. [Acedido a 30-08-2020]. Disponível em: <https://www.spedm.pt/grupo-de-estudo-da-tiroide/nova-formula-da-marca-eutirox/>

7. ANEXO

Tabela A - Equipa Técnica da FST

Diretora técnica	Dra. Juliana Pratas
Farmacêutico	Dr. José Catré
Farmacêutica	Dra. Cristiana José
Técnico de farmácia	Paulo Costa
Técnico de farmácia	Nuno Paiva
Auxiliar administrativa	Vanda Albuquerque

CAPÍTULO II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA **FARMACÊUTICA**

Laboratórios Basi

Orientado pela Dra. Joana Ramos

ABREVIATURAS

CQ	Controlo de Qualidade
GGQ	Gestão e Garantia da Qualidade
ITAs	Instruções técnicas de análise
LB	Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica S.A.
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PMTs	Especificações técnicas de material de embalagem
RARs	Relatórios para redução de análise
SWOT	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Treats</i>

RESUMO

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona aos estudantes a realização de outro estágio para além do de Farmácia Comunitária. Candidatei-me à realização de um estágio em Indústria Farmacêutica, mais especificamente no departamento de Controlo de Qualidade (CQ) nos Laboratórios Basi (LB).

Ao longo de aproximadamente três meses nos LB, apliquei muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica (MICF), nomeadamente das unidades curriculares de Assuntos Regulamentares, Tecnologia Farmacêutica e Gestão e Garantia da Qualidade (GGQ) e, adquiri muitos outros que foram fundamentais para o meu crescimento tanto pessoal como profissional.

O presente relatório apresenta-se disposto sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weakness, Opportunities e Threats*) onde são mencionados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que experienciei ao longo do estágio.

Palavras-chave: Análise SWOT, Controlo de Qualidade, Estágio, Indústria Farmacêutica.

ABSTRACT

The Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra provides students with of another internship in addition to Community Pharmacy. I applied for an internship in Pharmaceutical Industry, more specifically in the Quality Control department (CQ) at Basi Laboratories (LB).

Over approximately three months in LB, I applied many of the knowledge acquired throughout the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences (MICF), including the curricular units of Regulatory Affairs, Pharmaceutical Technology and Quality Management and Assurance (GGQ) and, I acquired many others that that were fundamental for my personal and professional growth.

This report, provided in the form of SWOT analysis, mention the strengths, weaknesses, opportunities and threats that I have experienced throughout the internship.

Keywords: SWOT Analysis, Quality Control, Internship, Pharmaceutical Industry.

I. INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) tem uma duração de 5 anos, em que os 4 primeiros anos têm uma componente fortemente teórica. O último semestre do curso é constituído pela disciplina “estágio curricular”, etapa fundamental, em que nos é facultada a possibilidade de realização de outro estágio, para além do estágio realizado em Farmácia Comunitária. Decidi candidatar-me à realização de um estágio curricular em Indústria Farmacêutica, nos Laboratórios Basi- Indústria Farmacêutica S.A. (LB), onde integrei a equipa do departamento de Controlo de Qualidade (CQ), orientado pela Dra. Joana Ramos.

A Indústria Farmacêutica sempre foi uma área que me despertou bastante interesse, uma vez, que estando em crescimento potencia a descoberta de novos medicamentos proporcionando: “maior esperança média de vida, melhor qualidade de vida e enormes ganhos em saúde para a humanidade” [1]. Para além de outras áreas, o farmacêutico tem aqui um papel fundamental, visto que é responsável por assegurar a supervisão de todo o processo, com base nos seus conhecimentos técnico-científicos bem como o respeito pelas boas práticas de fabrico.

O presente relatório apresenta-se sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), fazendo uma avaliação do estágio realizado nos LB, tanto numa perspetiva interna (Pontos Fortes e Pontos Francos) como externa (Oportunidades e Ameaças), tendo em consideração a aprendizagem e a adequação do MICF, bem como a sua adequação às perspetivas profissionais futuras.

2. O ESTÁGIO - LABORATÓRIOS BASI

Os LB são uma empresa de referência no fabrico nacional de produtos farmacêuticos, com a missão de desenvolver, fabricar, comercializar e distribuir medicamentos e soluções terapêuticas a nível global.

Fundados em 1956, em Coimbra, onde trabalharam durante vários anos. Em 2010, o departamento de CQ foi transferido para Mortágua, e em 2012 iniciou-se a produção de líquidos orais e pastosos na nova unidade de fabrico e desenvolvimento também em Mortágua, transferindo-se assim toda a empresa para lá. Nos últimos anos, têm surgido inúmeras alterações nos LB, sendo que uma das mais notórias ocorreu em 2016, em que implementaram um novo projeto para a produção de soluções parentéricas de grande e pequeno volume, tendo iniciado esta produção em 2019 [2].

Integrei a equipa do CQ, durante aproximadamente 3 meses, em que pude ter contacto com várias seções dentro do departamento do CQ.

2.1 ATIVIDADES DO ESTÁGIO

Assim que cheguei aos LB fui desde logo muito bem recebida, tendo sido o primeiro dia preenchido com formações de Higiene e Segurança no Trabalho. Formações estas, em conjunto com trabalhadores que iam iniciar funções na empresa. A primeira formação foi de “Sistema de Gestão da Qualidade” onde explicaram um pouco da história dos LB, a sua organização, os seus princípios básicos bem como os objetivos. A segunda formação foi “Formação de Integração” subdividida em “Gestão de Qualidade” e “Gestão Ambiental”, onde foram explicadas as normas de segurança da empresa, nomeadamente as regras impostas devido ao surgimento da COVID-19. No final deste dia, fui conhecer as várias secções do departamento do CQ, onde realizei o estágio.

A maioria do meu estágio realizou-se no “*open space*”, local amplo com inúmeras secretárias e computadores, onde trabalham os membros do suporte técnico de qualidade bem como os responsáveis dos laboratórios. Desde logo já no departamento do CQ, tive formações relativamente aos programas informáticos internos, que iria utilizar ao longo do estágio, onde tive acesso a uma secretária e a um computador.

Comecei a trabalhar com o *software* “Eazylims”, que serve para a gestão de *templates*, ou seja, para a gestão de um conjunto de ensaios e especificações associadas a um artigo. Depois de um *template* criado gera-se uma ordem de análise, que serve para os analistas se guiarem ao longo das análises. Comecei por rever *templates*, de material de acondicionamento e folhetos que posteriormente criava. Para rever e criar estes *templates* tinha que aceder ao “Q-Pulse” para confirmar e ver quais os ensaios necessários ao material. O “Q-Pulse” é um programa informático interno dos LB, que contém a maioria da documentação como especificações técnicas de material de embalagem (PMTs), instruções técnicas de análises (ITAs), relatórios para redução de análise (RARs) entre outros, este programa existe para ocorrer desmaterialização.

Passado duas semanas foi-me proposto ir para o laboratório de Microbiologia, no qual permaneci por três semanas. No laboratório de Microbiologia, comecei por ter formações sobre as regras de segurança e funcionamento e, ia acompanhando as diversas atividades. Pouco depois iniciei a sua realização começando com: a calibração do eletrodo de pH e da balança, depois o acerto das pipetas, placagem das placas de petri, contagem de colónias, preparação de meios de cultura, coloração de gram entre outras. Dias muito preenchidos, mas muito produtivos.

Passadas essas três semanas regresssei ao “*open space*”, onde voltei a realizar *templates* mas agora do produto acabado, aprendi e criei RARs, bem como ITAs e fiz alguns levantamentos e planeamentos necessários.

Devido ao tema da minha monografia, pedi para ver como ocorriam as análises cromatográficas, ao qual me foi dada autorização e onde permaneci durante um dia.

A meio do estágio deparei-me com a realização de uma auditoria interna, e quase no final do estágio com uma inspeção do Informed às instalações.

3. ANÁLISE SWOT

Por meio de uma análise SWOT serão realçados acontecimentos que influenciaram, tanto do ponto de vista interno como externo o meu estágio. Ao nível interno serão realçados os que influenciaram positivamente (Pontos Fortes) e negativamente (Pontos Fracos). Ao nível externo serão mencionados fatores que contribuíram para o meu crescimento (Oportunidades) e aqueles, que pelo contrário o prejudicaram (Ameaças).

3.1 PONTOS FORTES

3.1.1 Segurança em tempo de pandemia

Assim que cheguei aos LB foi-me logo medida a temperatura corporal e dada uma máscara. Numa das formações no primeiro dia, foram-me explicadas todas as medidas implementadas devido ao aparecimento da COVID-19, medidas estas que tinha que seguir.

Disseram-me que todos os dias de manhã à entrada dos LB, me iriam medir a temperatura e me dariam uma máscara, assim foi. Explicaram-me ainda, que tinha uma hora de almoço definida, pois cada departamento tinha uma hora de almoço diferente para não nos cruzarmos e que, existiam pontos para desinfeção das mãos distribuídos por vários locais. Já dentro do meu departamento, apenas podiam estar no balneário 3 pessoas de cada vez, andávamos no corredor pelas bordas num sentido e no outro, mantínhamos distanciamento de 2 metros e ainda todos os dias tudo era desinfetado nomeadamente as secretárias, portas, e os computadores.

Com todas estas medidas implementadas, senti-me completamente segura, sem receio de contágio.

3.1.2 Departamento Multidisciplinar

O departamento do CQ é constituído por inúmeras secções sendo as principais, um laboratório microbiológico, um laboratório físico-químico/cromatográfico, um laboratório de

investigação e desenvolvimento, uma farmacoteca, um “*open space*”, um arquivo e escritórios da direção técnica. Tive a oportunidade de os visitar a todos e exercer atividade em alguns deles.

Ao longo de todas as etapas de produção são enviadas amostras para análise, para assegurar que a produção está a correr como previsto, caso o CQ detete alguma alteração pode mesmo parar a produção. Ao mesmo tempo este departamento, está a elaborar documentação de produtos que estão e que se irão produzir.

O departamento do CQ é fundamental na Indústria Farmacêutica, visto que, está envolvido nos processos antes da produção, durante e no fim da mesma. Existe neste departamento uma responsabilidade muito grande uma vez, que garante que o medicamento vai para o mercado de acordo com o que está previsto. Este departamento, permitiu-me ter uma visão muito abrangente do trabalho desenvolvido numa Indústria Farmacêutica.

3.2 PONTOS FRACOS

3.2.1 Falta de Comunicação

A comunicação dentro de uma empresa é fundamental para um bom funcionamento, nomeadamente, numa empresa de dimensões consideráveis e em que, todos os departamentos/setores têm grande importância e ligação.

No departamento do CQ fazem-se inúmeras análises todo o dia, que vêm das diferentes áreas de produção. É necessário haver uma boa organização para se conseguir fazer todas as análises a tempo e horas. Com o surgimento da nova área de produção, de soluções parentéricas de grande e pequeno volume, ainda tem que ocorrer um esforço redobrado de organização, pois são produtos estéreis que necessitam de outros tipos de análises.

Principalmente da nova área de produção, a informação das amostras que iriam vir e quando para análise, nem sempre era certa. Mesmo as quantidades que viriam também por vezes não eram ditas, não permitindo assim gerir o tempo nem as quantidades para cada laboratório realizar as análises.

Senti que esta falta de comunicação levava a problemas de organização, um *stress* constante e gerava mais conflitos, o que considero que causava entropia na empresa tendo tido alguma influência ao longo do estágio.

3.2.2 Inúmeros Registos

Durante as semanas que estive no laboratório de Microbiologia, reparei que todas as tarefas têm que ser devidamente registadas. Os colaboradores, por vezes, passavam metade

do dia a fazer relatórios, preencher tabelas, *logbooks*, entre outros. Por exemplo o operador quando realiza uma análise microbiológica, tem que registrar as condições da câmara laminar no início e no fim da análise, depois na estufa, se for pôr a incubar tem que registrar o início e o fim da incubação, e mesmo quando põem o autoclave a funcionar têm que preencher no *logbook* a data, o programa e o ciclo do autoclave.

Todos os registos são obrigatórios e são feitos de acordo com as normas, mas isto torna-se muito desgastante para o operador, levando muito tempo no seu preenchimento enquanto poderia estar a realizar mais análises.

3.3 OPORTUNIDADES

3.3.1 Novas perspetivas

Ao longo do estágio tive a possibilidade de contactar com diferentes áreas dentro do departamento do CQ. Permaneci mais tempo na parte documental, mas também estive no laboratório de Microbiologia, fui pesquisar documentação no arquivo algumas vezes, estive no laboratório de Físico-química no computador a reunir dados e ainda fui um dia assistir às análises em cromatografia. Consegui ter um conhecimento muito de perto, do que se fazia neste departamento.

Toda a dinâmica vivida ao longo deste estágio, permitiu-me ter uma visão mais profunda da dinâmica de uma Indústria Farmacêutica e alargar horizontes.

3.3.2 Aquisição de competências ao nível informático

Uma vez que realizei a maioria do meu estágio no “*open space*”, trabalhei muito no computador, elaborando muitos documentos e fazendo muitas pesquisas. Através disso foi possível adquirir competências com os *softwares* da empresa, Q-Pulse® e Eazylims®, adquirir novas competências no *Microsoft Office Excel*, bem como também na pesquisa em Farmacopeias. Consultei ainda muitos outros programas, no entanto, um reduzido número de vezes pelo que não me permitiu assim, adquirir tantas competências.

Tendo tido contacto com estas diferentes ferramentas informáticas ofereceu-me a possibilidade de adquirir novas competências, revelando-se uma mais-valia tanto ao nível pessoal como no futuro ao nível profissional, uma vez que têm larga utilização em inúmeras tarefas.

3.3.3 Auditorias Internas/Externas

As auditorias consistem numa análise criteriosa, podem ser classificadas com externas ou internas, externas quando são realizadas por autoridades regulamentares ou clientes,

internas quando são efetuadas por auditores internos. As auditorias têm como objetivo obter evidências e a respetiva avaliação, para determinar em que medida os critérios da auditoria são satisfeitos, de forma a garantir a qualidade e conformidade dos produtos.

Durante o meu período de estágio os LB foram auditados várias vezes, tanto internamente, como extremamente por diversos clientes, sendo também alvo de inspeção por parte do Infarmed. Foi muito importante estar presente nesta altura nos LB, perceber a dinâmica e os procedimentos do processo, uma vez nunca tinha experienciado este processo que é tão importante para a Indústria Farmacêutica.

3.4 AMEAÇAS

3.4.1 Lacunas na formação académica

O plano do MICF é bastante abrangente, sendo-nos explicados inúmeros conceitos relacionados com a Indústria Farmacêutica, essencialmente em Assuntos Regulamentares, Tecnologia Farmacêutica e Gestão e Garantia da Qualidade (GGQ). Apesar dos conceitos, a perspetiva do funcionamento da Indústria Farmacêutica ficou um pouco aquém. Deveria haver uma maior ligação entre estas unidades curriculares e serem um pouco mais direcionadas para a prática. Realço este ponto mais ao nível da unidade curricular de GGQ, uma vez que a matéria lecionada centra-se na norma de qualidade. Sendo a qualidade o grande pilar da Indústria Farmacêutica, a matéria lecionada deveria ser mais voltada para o contexto real da Indústria Farmacêutica de forma a incentivar e proporcionar a compreensão da sua importância.

3.4.2 Subvalorização do farmacêutico

O farmacêutico é visto como um especialista do medicamento, assumindo uma posição de destaque na Indústria Farmacêutica, no entanto, a maioria dos colaboradores não têm essa formação académica, representando uma pequeníssima parte dos LB.

O MICF é multidisciplinar e muito abrangente, há várias áreas com que deveríamos ter contacto, como com a área informática e mesmo com a língua inglesa. Sendo pouco o conhecimento e a experiência nesta área, será necessário uma maior especificidade, um maior acompanhamento ao nível letivo, bem com uma possível adequação ao plano de estudos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Faculdade de Farmácia da Universidade dá-nos a excelente oportunidade de realizar outro estágio, para além de Farmácia Comunitária, nomeadamente em Indústria Farmacêutica, que nos ajuda a perceber as diferentes áreas da atividade farmacêutica.

Escolhi realizar o estágio nos LB no departamento do CQ. Quando escolhi este departamento ia com uma ideia muito reduzida do que realmente é, de todas as tarefas que realizam e de todas as responsabilidades que têm.

Foram aproximadamente três meses muito intensos, passei por várias áreas no departamento do CQ, realizei várias tarefas, conheci inúmeras pessoas e apliquei vários conhecimentos obtidos ao longo do MICF bem como adquiri muitos outros. Fui acolhida muito bem por toda a equipa do departamento, uma equipa jovem, dinâmica e trabalhadora, que, apesar de todo o trabalho e *stress* constante conseguiram sempre tirar um tempinho para me ajudar.

Este estágio foi fundamental no meu percurso, ajudou-me a perceber realmente como funciona a dinâmica da Indústria Farmacêutica, deu-me a oportunidade de viver novas experiências, crescer tanto ao nível pessoal como profissional, tendo sido uma mais-valia para o meu futuro.

5. BIBLIOGRAFIA

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Indústria Farmacêutica**. [Acedido a 02-09-2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>
2. LABORATÓRIOS BASI - **Relatório & Contas**, (2016). [Acedido a 24-08-2020]. Disponível em: <https://www.basi.pt/storage/app/public/relatorios/1502472164598de7e490d6e.pdf>

CAPÍTULO III

MONOGRAFIA

“CROMATOGRAFIA LÍQUIDA, AVANÇOS E INOVAÇÕES”

Orientada pelo Professor Doutor Ricardo Castro

ABREVIATURAS

2D-LC	Cromatografia líquida bidimensional
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
BEH	Partícula híbrida com ponte de etilsiloxano
C18	Grupo octadecil
C8	Grupo octil
C_M	Concentração do analito na fase móvel
C_S	Concentração do analito na fase estacionária
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
H	Altura do prato teórico
HILIC	Cromatografia de interação hidrofílica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
HSS	Sílica de alta resistência
k	Fator de retenção
K	Coefficiente de distribuição
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa
MS	Espectrometria de massa
N	Número de pratos teóricos
PDA	Detetor de arranjo linear de fotodíodos
R_s	Resolução
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
UHPLC/UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Pressão
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
W_b	Largura do pico
α	Seletividade

RESUMO

O mundo está em constante evolução, evolução esta bem marcada ao nível tecnológico, especialmente refletida com o desenvolvimento da cromatografia.

A cromatografia é uma técnica separativa na qual os compostos de uma amostra são separados com base nas diferenças de afinidade, entre a fase estacionária e a fase móvel. Os compostos migram através do sistema, sistema este constituído essencialmente por um reservatório de solventes, uma bomba, um injetor, uma coluna e um detetor. À medida que os compostos vão atingindo o detetor é enviado um sinal ao computador onde vão sendo representados picos, característicos de cada analito, gerando um cromatograma.

A cromatografia líquida (LC) é uma das técnicas separativas mais usadas nos laboratórios em todo mundo, existindo vários tipos de separação, de fases estacionárias, equipamentos e de fases móveis, sendo neste caso um líquido.

Ao longo dos anos, sucederam-se progressos significativos na cromatografia com o objetivo de se otimizar a separação de compostos, permitindo obter separações mais rápidas e de alta resolução, surgindo assim a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Esta técnica usa partículas de fase estacionária com tamanho entre 2 e 10 μm e opera com pressões até 400 bar, mas, os progressos não ficaram por aqui. A ciência continuou em evolução, diminuindo o tamanho das partículas da fase estacionária bem como os das colunas, surgindo assim a cromatografia líquida de ultra pressão (UHPLC). Em UHPLC as partículas possuem 2 μm ou ainda menos e os sistemas passaram a operar com pressões até 1200 bar.

Muitas empresas investiram nesta nova tecnologia nomeadamente a Thermo Fisher ou Agilent, sendo a pioneira a Waters através da criação de partículas sub-2 μm . A panóplia de equipamentos disponíveis nestas empresas é muito vasta, sendo umas mais focadas ao nível das colunas outras mais ao nível da transferência de métodos (HPLC para UHPLC). Todas estas empresas trabalham com o intuito de produzir sistemas com alta eficiência e resolução, capazes de suportar as elevadas pressões.

Com o surgimento desta técnica cromatográfica (UHPLC) as vantagens foram notórias, sendo possível obter separações muito mais rápidas, com melhor resolução e eficiência, gastando muito menos solvente, resultando daí ganhos significativos ao nível económico.

Palavras-chave: Colunas, Cromatografia Líquida, Cromatografia Líquida de Alta Pressão, Cromatografia Líquida de Ultra Pressão, Partículas.

ABSTRACT

The world is constantly evolving, an evolution that is well marked at the technological level, especially reflected with the development of chromatography.

Chromatography is a separative technique in which the compounds in a sample are separated based on the differences in affinity between the stationary phase and the mobile phase. The compounds migrate through the system, which consists essentially of a solvent reservoir, a pump, an injector, a column and a detector. As the compounds reach the detector, a signal is sent to the computer where peaks, characteristic of each analyte, are being represented, generating a chromatogram.

Liquid chromatography (LC) is one of the most widely used separative techniques in laboratories worldwide, with various types of separation, stationary phases, equipment and mobile phases, in this case being a liquid.

Over the years, significant progress has been made in chromatography in order to optimize the separation of compounds, allowing faster and higher resolution separations, thus emerging in high pressure liquid chromatography (HPLC). This technique uses stationary phase particles with size between 2 and 10 μm and operates at pressures up to 400 bar, but progress has not stopped here. Science continued to evolve, decreasing the size of the particles in the stationary phase as well as those of the columns, thus creating ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC). In UHPLC the particles are 2 μm or even less and the systems started to operate at pressures up to 1200 bar.

Many companies have invested in this new technology, namely ThermoFisher or Agilent, being the pioneer Waters through the creation of sub-2 μm particles. The range of available equipment at these companies is very wide, with some more focused at the level of columns, others more at the level of method transfer (HPLC to UHPLC). All of these companies are working in order to produce systems with high efficiency and resolution, capable of withstanding high pressures.

With the emergence of this chromatographic technique (UHPLC) the advantages were clear and it is possible to obtain much faster separations, with better resolution and efficiency, using much less solvent and resulting in significant gains at the economic level.

Keywords: Columns, Liquid Chromatography, High Pressure Liquid Chromatography, Ultra Pressure Liquid Chromatography, Particles.

I. INTRODUÇÃO

Grandes descobertas têm sido feitas ao longo dos anos, uma dessas grandes descobertas foi a cromatografia.

A técnica cromatográfica teve origem no termo grego “chroma+graphein”. Usada primeiramente pelo botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett no início do séc. XX. Este investigador desenvolveu várias experiências para a separação de extratos de plantas em colunas, usando um solvente orgânico como eluente e carbonato de cálcio como fase estacionária. Nestas experiências, verificou-se o aparecimento de várias bandas de cores nas colunas utilizadas devido à adsorção diferencial dos pigmentos corados na coluna, mostrando-se assim um importante método separativo [1].

Em 1952, John Porter Martin e Richard Laurence Millington Synge receberam o Prémio Nobel da Química pela invenção da cromatografia de partição [2].

Desde então, a tecnologia tem avançado rapidamente. Os investigadores descobriram os princípios básicos da cromatografia e concluíram que poderiam ser aplicados de várias maneiras, dando origem às diferentes cromatografias existentes. O desempenho técnico da cromatografia tem melhorado continuamente, permitindo assim a separação de moléculas cada vez mais semelhantes.

A cromatografia consiste num método separativo, na qual os componentes de uma amostra complexa são separados com base nas diferenças de afinidade entre a fase estacionária e a fase móvel [3].

A fase móvel, fase que viaja pelo sistema pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico, e a fase estacionária que é fixa no sistema pode ser, um sólido ou um líquido. A fase móvel passa através da fase estacionária com a qual é imiscível, e ambas as fases devem interagir tanto física como quimicamente com as moléculas da amostra, de forma a promoverem a sua separação [4].

Os compostos interagem de maneira diferente em relação à fase estacionária e à fase móvel, os que interagem fortemente com a fase estacionária ficam retidos, movendo-se lentamente com o fluxo da fase móvel. Em oposição, os componentes com interação fraca com a fase estacionária movem-se rapidamente com o fluxo da fase móvel eluindo primeiro, criando assim uma separação dos compostos [1, 5].

No processo de separação os compostos migram ao longo da coluna com velocidades diferentes. No final da coluna os compostos são detetados por um detetor, com a finalidade de os representar e identificar, através de um gráfico denominado de cromatograma, ilustrado na Figura 1.

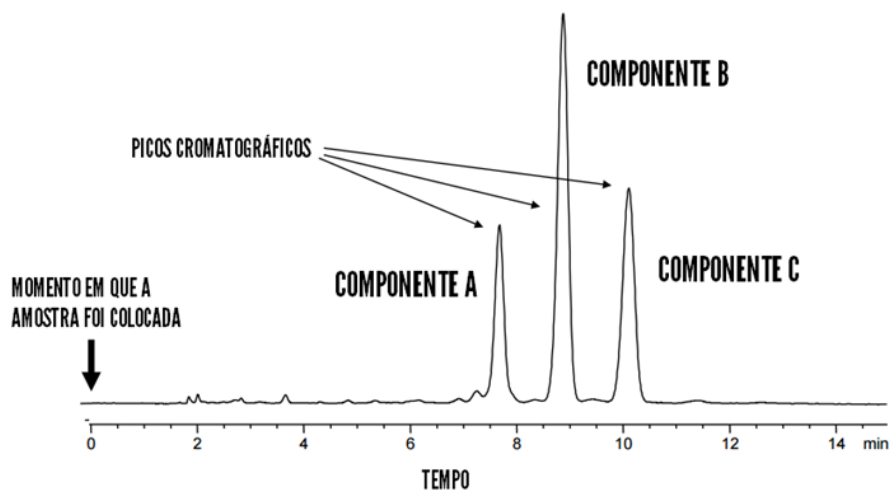


Figura 1 - Cromatograma com a separação dos compostos (Adaptado de [6]).

2. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

O cromatograma consiste numa representação da separação que ocorre no sistema, inicia-se quando a amostra é injetada e se verifica o surgimento de uma linha de base, que representa a fase móvel pura que vai passando pela célula de fluxo ao longo do tempo. À medida que o analito vai passando pela célula de fluxo é enviado ao computador um sinal que varia em função de cada analito, criando assim um pico representativo de cada um. Quando o analito passa completamente a célula do detetor o sinal retoma à linha de base [7].

Através do cromatograma podemos saber e calcular vários parâmetros básicos da separação. Alguns dos parâmetros que conseguimos retirar através da sua observação são: o tempo de retenção, (t_r), que é o tempo que decorre desde a injeção do composto até que este atinja o detetor, o tempo morto, (t_M), que representa o tempo que uma espécie que não interage com o a fase estacionária demora a atingir o detetor, bem como a largura dos picos representada por W_{b1} e W_{b2} [4]. Através destes parâmetros básicos, representados na Figura 2, podemos ainda calcular outros parâmetros característicos do processo separativo.

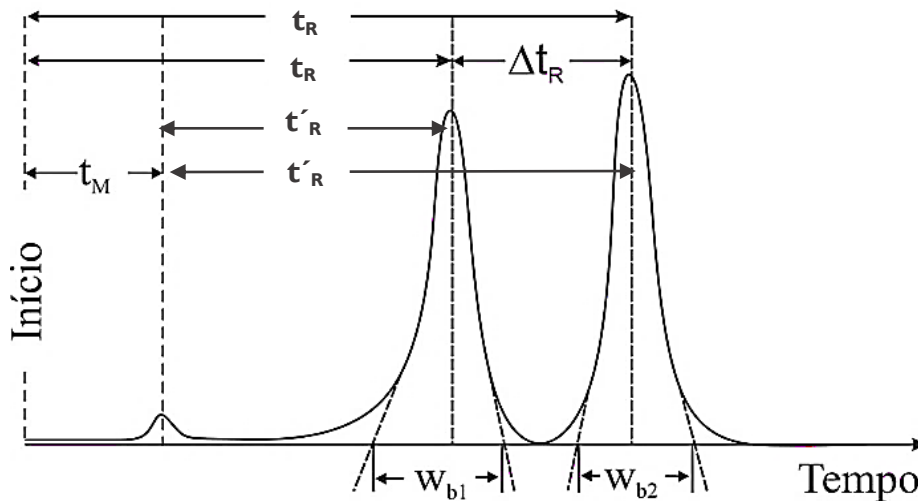


Figura 2 - Representação de um cromatograma com identificação de alguns parâmetros básicos (Adaptado de [4]).

2.1 FATOR DE RETENÇÃO (K)

O fator de retenção mede o período de tempo que o composto da amostra permanece na fase estacionária relativamente ao tempo que permanece na fase móvel. O seu cálculo é obtido dividindo o tempo de retenção ajustado de um composto (t'_R), pelo tempo de um composto não retido (t_M), tal como mostra a equação (1). Assim, para que os compostos sejam separados têm que interagir de forma diferente com a fase móvel e com a fase estacionária. Se $k=0$ significaria que não teria ocorrido nenhuma interação, este valor deverá estar compreendido entre 1 e 10 para que ocorra uma boa separação sem logos tempos de eluição [3]. Os parâmetros que podem influenciar o fator de retenção são essencialmente a fase móvel e a fase estacionária [1].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Equação (1)}$$

2.2 SELETIVIDADE (α)

A seletividade, também muitas vezes denominada de separação, corresponde à distância entre os máximos de dois picos ou através da divisão dos fatores de retenção pode ser expressa pela equação (2) [8]. Idealmente $\alpha > 1$, e quanto maior for este valor melhor será a separação dos compostos, pois se $\alpha = 1$ a separação não ocorreria [3].

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{\left(\frac{t_{R_B} - t_M}{t_M}\right)}{\left(\frac{t_{R_A} - t_M}{t_M}\right)} = \frac{t'_{R_B}}{t'_{R_A}} \quad \text{Equação (2)}$$

2.3 EFICIÊNCIA DA COLUNA

2.3.1 Teoria dos pratos teórico

Assumindo que a coluna pode ser dividida em vários segmentos, denominados de pratos teóricos, em que cada parte tem um dado comprimento e que a quantidade do composto na fase estacionária e na fase móvel obedece ao coeficiente de distribuição. Este coeficiente é representado por K e o seu valor é obtido através da equação (3), onde C_s e C_m são as concentrações do analito na fase estacionária e na fase móvel respectivamente [1]. O coeficiente de distribuição para cada composto é constante.

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Equação (3)}$$

A eficiência de uma coluna pode ser descrita usando o número de pratos teóricos (N) e calculada através da equação (4), pode também ser descrita através da altura do prato teórico (H), sendo este valor obtido dividindo o comprimento da coluna cromatográfica pelo número de pratos teóricos (N). A eficiência é muito utilizada para comparar o desempenho de colunas diferentes.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \quad \text{Equação (4)}$$

As colunas com maior número de pratos teórico e estas com uma altura reduzida, são mais eficientes e proporcionam o aparecimento de picos mais estreitos num determinado tempo de retenção, em comparação com as colunas com menor número de pratos teóricos [3].

Principais fatores que afetam a eficiência:

- Tamanho da coluna, que é influenciado pelo número de pratos teóricos, N , mas não pela altura de cada prato, H ;
- Tamanho da partícula, pois, diminuindo o tamanho da partícula aumenta a eficiência, no entanto tem que haver ponderação pois a pressão de retorno também vai aumentar;
- Viscosidade da fase móvel;
- Grau de retenção dos compostos.

2.3.2 Equação de Van Deemter

Durante vários anos, Van Deemter estudou a teoria da cromatografia e de vários assuntos relacionados com a mesma. Em meados do século XX propôs a equação que

representa a base da relação entre a eficiência da coluna e os vários parâmetros operacionais, equação essa denominada de Equação de Van Deemter, equação (5) [8].

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{Equação (5)}$$

H= altura do prato teórico

A= termo de difusão de Eddy. Termo influenciado pelo formato das partículas, pelo seu tamanho e pela forma como estas estão armazenadas na coluna. Enchimentos de coluna irregulares irão originar espaços vazios, maiores ou menores, o que faz com que as moléculas de analito percorram caminhos diferentes ao longo da coluna. Para reduzir a influência deste termo é necessário ter uma coluna com partículas o mais uniformes possíveis tanto em tamanho como em formato [4].

B= termo de difusão longitudinal. As moléculas atravessam a coluna sob influência da fase móvel e dos seus movimentos de difusão, quanto maior for a velocidade da fase móvel menor será a difusão das moléculas e menos influencia terá este termo [4].

C= termo de resistência durante a transferência de massa. Entre a fase móvel e a fase estacionária não há um equilíbrio perfeito, pois a fase estacionária exerce uma certa resistência à passagem da fase móvel juntamente com a molécula, e a difusão através da fase estacionária é um processo relativamente lento. O equilíbrio só aconteceria se a fase móvel estivesse em contacto com a fase estacionária durante um período de tempo mais longo, o que na prática não acontece [8]. A influência deste termo pode ser diminuída utilizando fases móveis com baixa viscosidade ou colunas preenchidas com partículas muito pequenas [4].

u= velocidade linear. Representa o fluxo da fase móvel [8].

A equação de Van Deemter é expressa graficamente através da curva representada na Figura 3, que ilustra um gráfico da altura do prato teórico em função da velocidade da fase móvel.

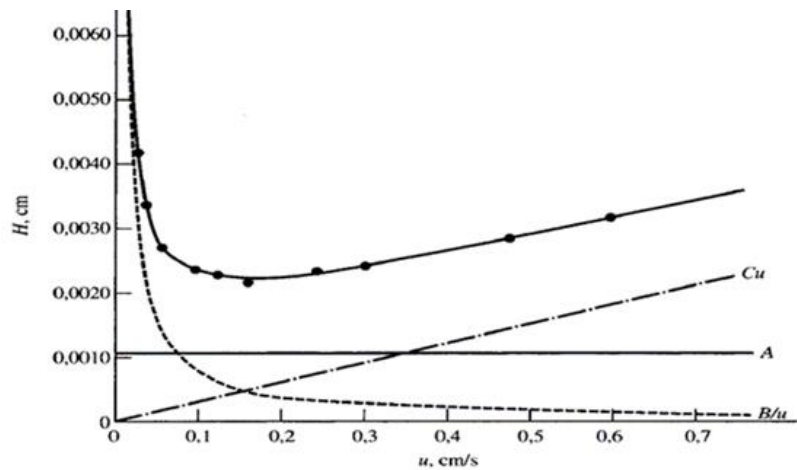


Figura 3 - Representação gráfica da equação de Van Deemter (Adaptado de [9]).

Através da curva representada na Figura 3 podemos observar que o termo A é independente de u , sendo constante numa dada separação pois depende do tamanho das partículas e do processo de enchimento [10]. O termo B, em condições operacionais normais tem uma contribuição insignificante, uma vez que o coeficiente de difusão num meio líquido é muito pequeno e será tanto mais pequeno quanto maior for a velocidade de passagem do eluente, havendo menos tempo para ocorrer difusão [8]. Quanto ao termo C, este aumenta linearmente com a velocidade da fase móvel tendo assim uma contribuição considerável para a curva.

A curva de Van Deemter é muito útil para prever a velocidade linear ideal, e é através disso que se consegue uma menor altura de pratos teóricos e se alcança uma maior eficiência. Assim na região onde a altura do prato teórico (H) é mínima, retira-se a velocidade de fase móvel ideal para se obter a maior eficiência de separação. Para ser possível obter essa região é necessário otimizar condições cromatográficas, tais como a composição da fase móvel e/ou da fase estacionária e alterar o fluxo para verificar se as separações melhoram. Se ocorrerem melhorias será observado no perfil do cromatograma, picos mais finos e bem resolvidos. As curvas de Van Deemter são assim muito utilizadas pelos fabricantes para enaltecerem as performances das suas colunas comparativamente com as dos competidores [11].

2.4 RESOLUÇÃO (R_s)

A resolução é uma medida quantitativa que reflete a extensão de separação de dois picos. A resolução (R_s) é dada pela equação (6) e para a sua determinação considera-se a largura dos picos (W) bem como os respetivos tempos de retenção (t_R) [4].

$$R_S = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{W_A + W_B} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad \text{Equação (6)}$$

Eficiência
Seletividade
Retenção

A resolução pode ser expressa em termos de eficiência, seletividade e retenção, equação (6), mostrando assim que pode ser afetada ou melhorada por estes três parâmetros importantes, Figura 4 [8]. Através da Figura 5 podemos verificar o grau de separação em função da resolução, e que para uma resolução de 1,5 ou superior entre dois picos a separação é completa e o resultado quantitativo é preciso [12].

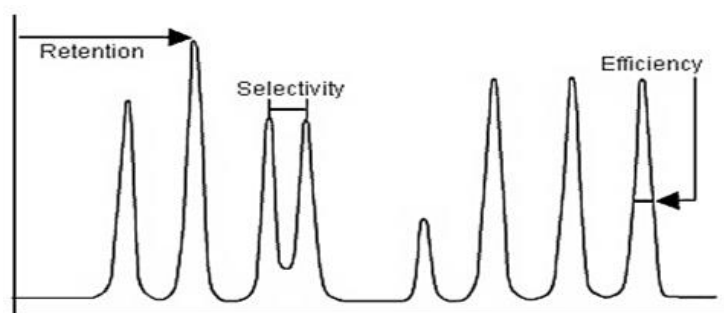


Figura 4 - Parâmetros que influenciam a resolução (Adaptado de [12]).

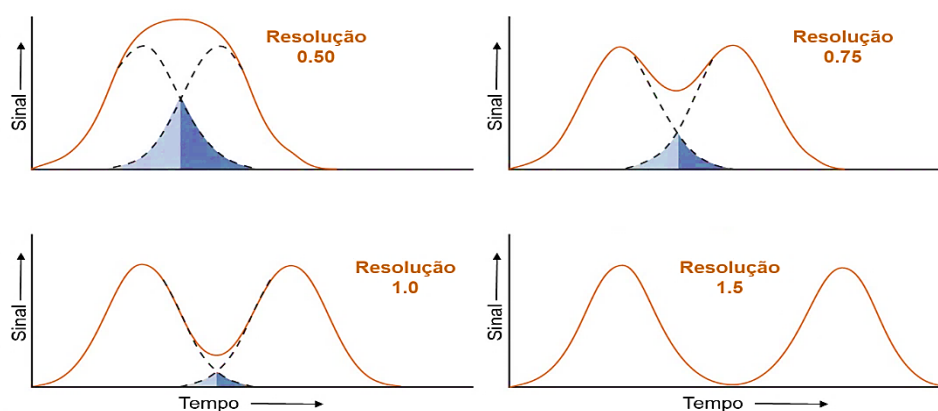


Figura 5 - O efeito da resolução na separação dos picos cromatográficos.

3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida (LC) é o tipo de cromatografia mais usada, tanto para análises químicas em laboratórios clínicos como biomédicos. Neste tipo de cromatografia a fase móvel é um líquido, tendo como principal vantagem trabalhar diretamente com amostras líquidas sendo a maioria das amostras clínicas ou biológicas.

Anteriormente, usavam-se colunas tubulares abertas e os suportes usados nas colunas de LC eram compostos por partículas grandes e de formatos irregulares, levando horas ou

mesmo dias para as separações se desenvolverem. Este tipo de suportes não era adequado para muitas das aplicações, resultavam picos largos e separações com baixa resolução. Para além disso, a estabilidade mecânica destes suportes era limitada e só podiam ser usados em operações com pressões relativamente baixas [3].

Posteriormente, começaram a haver progressos no sentido de se obterem separações rápidas e de alta resolução. Os suportes passaram a ser mais pequenos e mais estáveis mecanicamente, permitindo a obtenção de picos mais estreitos, uma melhor separação e limites de deteção mais baixos surgindo o método conhecido por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) [13].

3.1 TIPOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Existem vários métodos cromatográficos líquidos que são classificados com base nos mecanismos físicos ou químicos com que os produtos químicos se separam. Alguns dos principais métodos cromatográficos, baseados nos mecanismos de separação são: Cromatografia de Partição, Cromatografia de Adsorção, Cromatografia de Troca Iónica, Cromatografia de Exclusão e Cromatografia de Afinidade, representados esquematicamente na Tabela I [3].

- Cromatografia de Partição

É um dos métodos mais utilizados, na qual os solutos são separados com base na sua distribuição entre a fase móvel líquida e a fase estacionária, tal como representado na Tabela I. A fase estacionária líquida está ligada quimicamente a um suporte sólido, sendo a maioria destes suportes constituídos por sílica. A retenção nestas colunas dependerá: da quantidade da fase ligada e da sua natureza, da área superficial do suporte, do tamanho dos poros do suporte e da quantidade de grupos acessíveis no mesmo, que no caso da sílica são os grupos silanol [3].

Dentro da cromatografia de partição existem dois tipos principais de cromatografia com base na polaridade da fase estacionária, sendo eles: a **cromatografia em fase normal** e a **cromatografia em fase reversa**. A **cromatografia em fase normal** é um tipo de cromatografia em que a fase estacionária é polar, como por exemplo a sílica gel, o cianopropil ou amina. Como este método possui uma fase estacionária polar terá uma maior retenção para compostos polares e normalmente é utilizado para a separação de compostos sensíveis à água ou isómeros geométricos, esta cromatografia tem uma utilização diminuta em relação à cromatografia em fase reversa [3]. A **cromatografia em fase reversa** é o tipo de cromatografia de partição mais encontrado nos laboratórios em que a fase estacionária é

apolar sendo normalmente constituída por grupos octadecil (C18) ou octil (C8) ligados a um suporte, como a sílica. A fase móvel mais utilizada nesta cromatografia é um solvente polar, como por exemplo, a água com uma baixa concentração de um solvente orgânico miscível tal como o metanol ou o acetronitrilo. Sendo a fase estacionária apolar, os compostos apolares terão uma maior retenção na cromatografia em fase reversa e este tipo de cromatografia é útil para a análise e separação de produtos químicos em sistemas aquosos, como é o caso da urina, do sangue ou do soro [3].

- Cromatografia de Adsorção

Cromatografia também denominada líquido-sólido, em que os produtos químicos são retidos com base na sua adsorção/dessorção à superfície do suporte. Tanto o analito como as moléculas da fase móvel competem para se ligarem à superfície do suporte tal como ilustrado na Tabela I. O grau de retenção de um produto químico dependerá: da força de ligação do produto ao suporte, da área superficial do suporte, da força de ligação da fase móvel ao suporte e da quantidade de fase móvel que se move, podendo ainda ser influenciado por ligações de hidrogénio, forças de Van Der Waals, interações eletrostáticas ou interações dipolo-dipolo.

Os adsorventes mais usados na cromatografia de adsorção são: os polares ácidos e os polares básicos. O suporte polar ácido mais usado na cromatografia de adsorção é a sílica, este tipo de suporte tende a adsorver compostos polares e básicos. O principal tipo de adsorvente polar e básico usado é a alumina [3].

- Cromatografia de Troca Iónica

Tipo de cromatografia líquida em que as substâncias são separadas devidos às suas cargas, por adsorção à um suporte que também contem cargas na sua superfície, representado na Tabela I. Os iões fixos que estão ligados ao suporte, que atuam como fase estacionária, interagem com os iões da amostra ou da fase móvel que têm cargas opostas, podem ser aniões ou catiões. Alterar o tipo ou a concentração dos iões opostos da fase móvel é a forma mais comum para se ajustar a retenção dos iões do analito. A retenção pode ainda ser afetada pelo pH, pela carga dos iões fixos da fase estacionária bem como pela densidade desses mesmos iões fixos [1].

Este tipo de cromatografia líquida por norma utiliza resinas de troca iónica, que são materiais com a capacidade de permuta de iões frequentemente utilizadas para a separação e análise de aminoácido e proteínas. Pode ainda ser aplicada na purificação da água, através da

separação de catiões e aniões orgânicos e inorgânicos por forma a obter-se água desionizada [3].

- Cromatografia de Exclusão Molecular

A cromatografia de exclusão molecular foi a primeira com utilização comercial para HPLC. Neste método as moléculas são separadas com base na diferença entre o seu tamanho e os poros da fase estacionária, para a separação é utilizado um suporte poroso, inerte e sem interações entre os compostos da amostra e a fase estacionária, esquematizado na Tabela I. À medida que a amostra percorre a coluna as moléculas irão difundir pelos poros, os componentes mais pequenos podem entrar em todos ou na maioria dos poros do suporte, assim as moléculas maiores eluem primeiro da coluna e por último eluem as moléculas menores [1].

Muitos tipos de suportes podem ser usados, como por exemplo o dextrano ou a sílica, para trabalhar com amostras aquosas e biológicas. Nesta técnica a separação é baseada na diferença física e não nas interações químicas, a escolha da fase móvel é determinada pela solubilidade dos analitos desejados e pela estabilidade do suporte e da coluna. A fase móvel poderá ser um solvente polar ou apolar, Se for um solvente aquoso e o suporte a sílica o método é frequentemente chamado de filtração em gel, se a fase móvel for um solvente orgânico e o suporte o poliestireno o método de exclusão é denominado de permeação em gel [3].

- Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade usa interações seletivas e reversíveis encontradas em muitos sistemas biológicos, para a retenção e separação do analito. Exemplos destas interações é o caso de uma enzima com um substrato ou a ligação de um anticorpo a um antigénio, ilustrado na Tabela I. A fase estacionária é preparada imobilizando um composto num suporte que se vai denominar ligante de afinidade. Realiza-se aplicando a amostra na coluna sob determinadas condições para se poder estabelecer uma ligação específica e forte do ligante ao composto de interesse [3]. O processo é realizado na presença de uma fase móvel denominada por tampão, uma vez que, imita o pH e as condições ideais para que ocorra a ligação. Através desta interação o composto alvo vai-se ligando à medida que os restantes compostos são lavados, posteriormente o alvo é libertado da coluna através de um tampão de eluição que contem um agente concorrente ou alterando o pH. Devido a estas alterações, a força de ligação diminui o que levará à separação do alvo ao ligante de afinidade [1].

Tabela I - Resumo e ilustração dos cinco principais tipos de Cromatografia Líquida.

Tipos de Cromatografia Líquida	
<p>Partição Separação baseada na interação dos produtos químicos com a fase líquida do suporte.</p>	
<p>Adsorção Separação baseada na adsorção de produtos químicos à superfície do suporte.</p>	
<p>Troca Iônica Separação das substâncias carregadas através da adsorção às cargas fixas do suporte.</p>	
<p>Exclusão Molecular Separação das moléculas com base no seu tamanho e na sua capacidade de entrar no suporte poroso.</p>	
<p>Afinidade Separação com base em interações biológicas.</p>	

4. HPLC

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) existe desde os anos de 1960. É uma técnica analítica usada para separação de compostos não voláteis, biológicos e solúveis num solvente específico, podendo ser utilizada vastamente desde compostos farmacêuticos, compostos termicamente instáveis a poluentes ambientais. A finalidade desta técnica consiste em identificar, quantificar e purificar os compostos de uma amostra tem sido predominantemente usada nos laboratórios em todo o mundo ao longo de vários anos e mostrando extrema eficácia na separação de compostos muito semelhantes [8]. Nos últimos anos tem-se vindo a aprimorar, gerando uma maior eficiência, versatilidade, velocidade de separação e limites de deteção mais baixos. Este método possui uma ampla gama de fases estacionária, solventes e detetores, bem como vários mecanismos de separação. Pode trabalhar com pressões até 400 bar, mas recentemente têm-se desenvolvido sistemas com partículas menores e que operam a pressões ainda mais elevadas, ao qual se classificou como cromatografia líquida de Ultra Pressão (UHPLC) [14].

5. UHPLC

O avanço significativo na instrumentação e na tecnologia, através da utilização de colunas e partículas de suporte “menores” permitiram a introdução da Cromatografia Líquida de Ultra Pressão (UHPLC) [15, 16].

Categoria de LC introduzida pela primeira vez em 2004 pela Waters com base em partículas sub-2 µm ao qual denominou UPLC, ficando assim a sua marca comercial [5]. Quando outros fornecedores entraram no mercado com sistemas semelhantes designaram-nos de UHPLC, pois não poderiam utilizar o nome comercial da Waters [17].

As empresas, nomeadamente as farmacêuticas, são motivadas a criar ferramentas mais eficientes tanto para a descoberta, como para o desenvolvimento e controlo de medicamentos, sendo determinante um método cromatográfico eficaz [15]. Ocorreram inovações tanto na conceção de novos instrumentos como na tecnologia de partículas. Devido à utilização de partículas reduzidas este método pode alcançar pressões muito elevadas, geralmente até aos 1200 bar permitindo um novo nível de desempenho cromatográfico [3]. Através desta tecnologia é possível separações com redução do tempo de análise proporcionando novos níveis de resolução, velocidade e sensibilidade, permitindo aumentar a produtividade [17].

6. COMPONENTES DO SISTEMA

A LC de hoje requer equipamento muito especial, o qual deve conter: um reservatório inerte e bem limpo que retém a fase móvel, misturadores de solventes extremamente precisos, bombas de alta pressão que consigam gerar e medir taxas de fluxo da fase móvel constantes e válvulas de alta precisão. Requer ainda, um injetor capaz de injetar a amostra com fluxo contínuo no fluxo da fase móvel para a coluna, uma coluna de alta eficiência que contem a fase estacionária e um detetor de alta sensibilidade para detetar as bandas relativas aos compostos separados à medida que saem da coluna, uma vez que a maioria dos compostos não se conseguem ver a olho nu [13, 18]. Os componentes básicos do sistema estão representados na Figura 6.



Figura 6 - Componentes básicos de um sistema HPLC/UHPLC (Adaptado de [19]).

6.1 RESERVATÓRIO DE SOLVENTES/ MISTURA DE SOLVENTES

O reservatório de solventes/fase móvel é um recipiente inerte e limpo, podendo ser de plástico ou vidro (mais comum), para análise de pequenas moléculas impedindo a lixiviação de matérias de plástico para o eluente.

A sua capacidade varia geralmente entre 0,5 a 2 L de solvente. Deverá ser constituído por uma tampa que facilite a entrada de tubulações, impeça a entrada de poeiras, reduza a evaporação do solvente e permita a pressurização da garrafa [13].

Todos os solventes/fases móveis devem ser filtrados bem como desgaseificados uma vez que, podem ter gases e poeiras dissolvidos que irão interferir no desempenho do sistema [8]. Os desgaseificadores são usualmente adicionados aos sistemas de HPLC/UHPLC com o propósito de reduzir o ar dissolvido e remover pequenas bolhas de gás, que possam interferir nos sistemas de deteção e originar problemas na linha de base. A remoção do ar pode ser realizada através de sistemas de borbulhamento, na qual os gases dissolvidos são removidos por ação de pequenas bolhas de gases inertes e de baixa solubilidade, tal como o hélio ou nitrogénio, não solúveis na fase móvel. A desgaseificação também pode ser conseguida aplicando um vácuo ao reservatório ou um sistema de destilação. Na linha de entrada da fase móvel muitas das vezes é colocado um filtro, para remover partículas ou possíveis precipitados que se tenham formado, de forma a evitar danos no restante sistema e prolongar a vida útil da coluna [3].

A composição e a velocidade da fase móvel são fatores que podem ser ajustados para controlar a separação cromatográfica. Na escolha dos solventes ou das soluções deve-se ter

em consideração a miscibilidade e a viscosidade, uma vez que podem resultar misturas inadequadas originando um mau desempenho cromatográfico ou uma má separação [3].

Durante a separação a composição da fase móvel pode permanecer constante denominando-se por eluição isocrática e os solventes são misturados previamente, se a composição da fase móvel variar ao longo do tempo denomina-se eluição por gradiente. Várias técnicas têm sido usadas para fazer variar esta composição, nomeadamente a câmara de mistura pode ser colocada antes da bomba com quantidades controladas de cada eluente ou usando válvulas que alteram os solventes que estão a percorrer o sistema LC num determinado momento. Este mesmo gradiente pode ser conseguido usando o mesmo tipo de válvulas, ligadas a dois ou mais reservatórios de solventes, que posteriormente passam para uma câmara de mistura e depois entram na bomba, conhecido com mistura de baixa pressão. Pode também ser utilizada uma mistura de alta pressão, em que duas ou mais bombas estão ligadas a um solvente ou a soluções diferentes, as taxas de fluxo vão variando para controlar a mistura. Esta solução misturada é então passada para a câmara de mistura de alta pressão localizada após a bomba, para depois ir para a coluna.

A mistura de baixa pressão é mais económica que a mistura de alta pressão uma vez que esta só utiliza uma bomba, no entanto, acarreta problemas dado que é mais suscetível à formação de bolhas porque os solventes estão a ser misturados à pressão atmosférica, daí a necessidade de serem aplicados desgaseificadores em linha [13].

6.2 BOMBA

O objetivo da bomba consiste em fornecer com exatidão, precisão, fluxo reprodutível, constante e sob alta pressão, a fase móvel através da fase estacionária, para a coluna.

Na maioria dos sistemas de HPLC, o limite superior da pressão das bombas é de aproximadamente 400 bar. Mas nos últimos anos foram introduzidos os sistemas de UHPLC em que o limite superior de pressão das bombas pode ir até aos 1200 bar [3].

Atualmente, a maioria das bombas em uso são baseadas no projeto do pistão alternativo (bomba recíproca) podendo também usar-se bombas de seringa.

Os constituintes da bomba recíproca, Figura 7, são: uma câmara cilíndrica que segura o pistão, um motor que manobra uma came motriz e à medida que o motor gira o pistão é movido para dentro e para fora da câmara, uma vedação e um par de válvulas de retenção. As válvulas de retenção servem para controlar a direção do fluxo da fase móvel através da bomba. Estas válvulas contêm uma bola de rubi e um apoio de safira para garantir uma vedação sem vazamento da fase móvel quando a bola assenta, sendo que na maioria das bombas os pistão são feitos de safira, mas por vezes usa-se aço inoxidável e grafite [13].

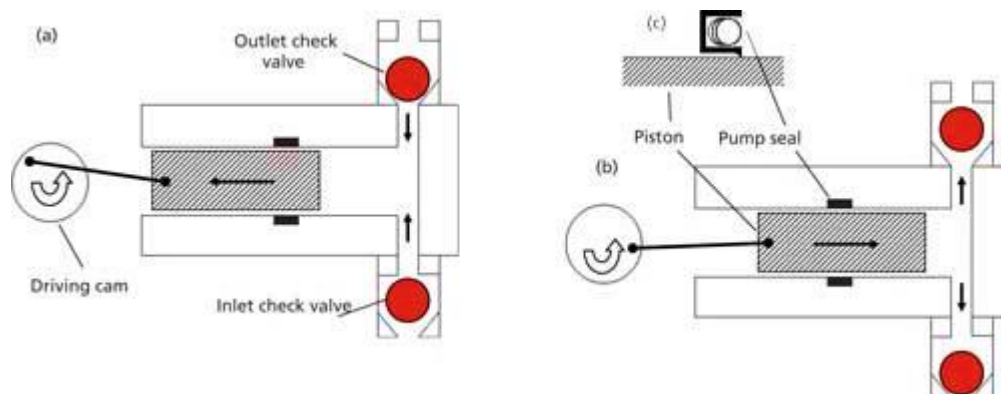


Figura 7 - Representação esquemática da bomba recíproca (Adaptado de [7]).

Nas bombas recíprocas o movimento recíproco do pistão faz com que se gere algumas alterações na pressão do fluxo (fluxo pulsado) e na fase móvel, o que pode aumentar o ruído da linha de base detetado em muitos detetores. Estas alterações podem ser minimizadas pelo controlo eletrónico da bomba e pela colocação de amortecedores no caminho do fluxo. Nas bombas com um único pistão a fase móvel é entregue à coluna apenas em metade do tempo, pois na outra metade do tempo tem que se encher a câmara de solvente para voltar a ser entregue à coluna, trabalhando com uma taxa de fluxo de ml/min [3]. Com o aparecimento de bombas de duplo pistão ambos os pistões podem funcionar simultaneamente ou intercalados entre si, logo a fase móvel vai para a coluna todo tempo fornecendo um fluxo com pulsação praticamente inexistente [13].

No entanto, as bombas de seringa fazem uma aplicação contínua na câmara do solvente para fornecer a fase móvel ao restante sistema, esta fase móvel pode ser fornecida com um fluxo praticamente constante e podem ser usadas taxas de fluxo muito mais baixas ($\mu\text{l}/\text{min}$) do que as das bombas recíprocas. Contudo, quando se executa a programação de solventes ou para aplicação de volumes consideráveis de fase móvel na coluna, as bombas de seringa não são tão utilizadas como as bombas recíprocas [3].

As bombas de UHPLC seguem os mesmos princípios referidos anteriormente, mas trabalham a pressões superiores, pressões estas necessárias uma vez que são utilizados suportes de pequeno diâmetro [13].

6.3 INJETOR

O injetor, também denominado dispositivo de introdução da amostra, é usado para introduzir a amostra no sistema. O método de injeção mais amplamente usado é baseado num *loop* que vai variando a sua posição no caminho do fluxo da fase móvel, através da permutação de uma válvula. Normalmente são usadas válvulas com seis orifícios e duas posições, uma de

enchimento (*load*) e outra de injeção (*inject*), quando a válvula está na posição de enchimento o *loop* é preenchido, e quando esta está em modo de injeção a amostra é transportada para a coluna [13].

A introdução da amostra poder ser através de controlo manual ou pelo uso de amostradores automáticos. Algumas características a ter em conta para selecionar o sistema de injeção são: a reprodutibilidade, a quantidade de amostra transferida de uma injeção para a seguinte e a faixa de volumes que podem ser injetados, varia geralmente entre 5 a 500 μL [3]. Os sistemas de injeção manual são a opção mais económica, no entanto os amostradores automáticos melhoram a reprodutibilidade da injeção e têm a capacidade de injetar várias alíquotas de amostra. Alguns destes sistemas podem controlar a temperatura numa faixa entre 4-60°C, este controlo é útil para quando se pretende analisar amostras com estabilidade limitada ou quando se pretende analisar um grande lote de amostras [13]. Através dos amostradores automáticos também é possível misturar uma amostra e um reagente para derivatização. A derivatização é usada para melhorar as propriedades cromatográficas e a deteção dos analitos, pode também ser usada para alterar a separação de um composto de outros produtos químicos através da alteração da sua estrutura e da sua retenção na coluna. Tanto o controlo da temperatura como o processo de derivatização são efetuados antes da injeção [3].

6.4 COLUNA

A coluna é o local onde ocorre a separação existindo uma grande variedade das mesmas através da combinação de materiais, diâmetros e comprimentos. A sua escolha deve ser o mais adequada possível uma vez que é o ponto-chave para o sucesso cromatográfico [1].

O tamanho das colunas varia consoante a sua finalidade, as dimensões comuns são 2 a 5 mm de diâmetro interno e comprimentos que podem variar entre 5 a 30 cm. Com o avanço das tecnologias foram-se produzindo colunas com diâmetros internos e volumes cada vez menores, sendo possível melhorar a eficiência e alcançar limites de deteção mais baixos. Para além da maior eficiência também exigem fluxos mais baixos e volumes de fase móvel menores, tendo como vantagem um consumo mínimo de solvente.

Estas são construídas essencialmente por tubos de aço inoxidável para operarem a altas pressões, vidro para biomoléculas ou mesmo outros materiais para análise de determinados analitos [8].

As colunas de LC são facilmente degradadas através de impurezas da amostra ou de solventes, devido a isso é colocada uma coluna curta de proteção (pré-coluna) antes da coluna analítica para proteger a sua integridade e para prolongar a sua vida útil, uma vez que a coluna

analítica é muito cara. A pré-coluna é composta pela mesma fase estacionária que a coluna analítica, mas possui partículas de tamanho maior para evitar quedas de pressão. Para além da pré-coluna, pode colocar-se um filtro entre o injetor e a coluna de proteção para remover possíveis partículas [13].

Para o empacotamento das colunas foram desenvolvidas várias partículas, partículas essas porosas com diâmetros que variam entre 1,8 a 10 μm , sendo as mais usuais as de 5 μm , 3,5 μm e 1,8 μm . O uso de partículas de menor diâmetro fornece melhor eficiência ao sistema cromatográfico, mas tem que se ter em consideração pois leva a um aumento da contrapressão na coluna. O empacotamento das colunas é efetuado a altas pressões para garantir a sua estabilidade durante o uso [3].

Muitas das separações efetuadas por HPLC são realizadas à temperatura ambiente. No entanto, o controlo da temperatura é importante para gerar tempos de retenção reprodutíveis e melhorar a reprodutibilidade cromatográfica bem como a eficiência da separação. Este controlo pode ser alcançado através de diversas técnicas nomeadamente coletes de água, blocos de aquecimento/ resfriamento [13].

A técnica de UHPLC utiliza partículas de tamanho inferior e colunas de menores dimensões em comparação com as utilizadas em HPLC, levando a uma maior contrapressão. Posto isto, em UHPLC é requerido um aquecimento da coluna para aumentar o fluxo da fase móvel com o intuito de diminuir a contrapressão melhorando desta forma a eficiência do sistema [5]. Um aumento da temperatura vai fazer com que a viscosidade da fase móvel diminua, as velocidades de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel aumentem, levando a um aumento das velocidades de fase móvel e por sua vez um menor tempo de análise. Este aumento de temperatura é determinado pelo ponto de ebulição e pela pressão de vapor da fase móvel bem como pela estabilidade da amostra, uma vez que o analito pode requerer uma separação a temperatura reduzida [3].

6.5 DETETOR

Quando os compostos saem da coluna vão para o detetor, onde algumas das propriedades físicas e químicas dos analitos são traduzidas e monitorizadas. Entre a coluna e o detetor pode estar presente um reator pós-coluna para derivar alguns dos compostos e se obter um sinal mais forte e mais específico no detetor [4].

Os constituintes da amostra podem ter características muito diferentes e por isso foi necessário o desenvolvimento de vários tipos de detetores, nomeadamente: detetor de absorvância UV/Vis para composto que absorvem luz na região UV/Vis, detetores de

fluorescência se o composto for fluorescente, um detetor um pouco mais universal como o detetor de índice de refração, entre outros [5].

As características ideais para um detetor de LC são: uma alta sensibilidade, linearidade, boa estabilidade, reprodutibilidade, um tempo de resposta curto e um baixo volume morto sendo que a sua escolha dependerá sobretudo das características do analito de interesse. Em UPLC os picos são normalmente muito estreitos e o tempo de análise muito curto, logo a configuração da velocidade de aquisição do detetor deve ser criteriosa, de forma a assegurar-se uma obtenção de pontos suficientes para se poder representar um pico adequadamente, porém definir-se uma taxa de detecção muito alta também fará com que o ruído da linha de base aumente.

A maioria dos detetores são não destrutivos, o que é uma vantagem, e podem também ser usados individualmente ou ligados entre si permitindo usar várias técnicas de detecção numa única análise [8].

- Detetores de absorvância ultravioleta/ visível (UV/Vis)

Neste tipo de detetores, à medida que os compostos saem da coluna são detetados através da absorção de luz visível ou ultravioleta, sendo o sinal proporcional à sua concentração. A fase móvel deve ser cuidadosamente selecionada de forma a absorver a menor radiação possível no comprimento de onda de interesse [13].

Existem três configurações comuns para os fotodetetores UV/Vis, nomeadamente os fotodetetores de comprimento de onda fixo, fotodetetores de comprimento de onda variável e de arranjo linear de fotodíodos (PDA). O detetor de comprimento de onda fixo consiste num fotómetro que mede a absorção de luz dos compostos num comprimento de onda previamente definido, este detetor é o mais sensível e o mais barato das configurações referidas. O detetor de comprimento de onda variável usa uma banda larga de comprimentos de onda, tendo vantagem na flexibilidade de seleção do comprimento de onda e também tem a capacidade de operar a comprimentos de onda de baixa radiação UV. O detetor PDA mede a absorção em todos os comprimentos de onda simultaneamente, o que permite gerar um espectro em tempo real à medida que o soluto é eluído [3].

- Detetores de fluorescência

Para que ocorra fluorescência um produto químico tem que absorver luz num determinado comprimento de onda e emitir a luz noutra comprimento de onda quando volta ao estado fundamental [13]. Estes detetores são muito específicos e possuem alta sensibilidade e seletividade para substâncias que apresentem fluorescência. No entanto, poucos compostos

são naturalmente fluorescente sendo normalmente necessário derivatizar o analito de interesse [8].

- Detetores eletroquímicos

Medem a corrente correspondente à oxidação ou redução de compostos à medida que saem da coluna. Para uma correta detecção eletroquímica tem que se ter em conta as características redox que os compostos têm na fase móvel. Estes detetores possuem uma alta sensibilidade e seletividade [13].

- Detetores condutimétricos

Detetam a presença de iões sendo usados sobretudo na cromatografia de troca iónica. Medem a capacidade do eluente conduzir uma corrente elétrica quando colocado num campo elétrico. O sinal detetado estará assim relacionado com a concentração do ião, com a sua carga e com a sua mobilidade [3].

- Detetores de índice de refração

Este tipo de detetores utiliza a capacidade de um composto ou solvente desviar a luz, esta medição é efetuada quando os compostos passam através de uma célula de fluxo. Este detetor é considerado o mais próximo do universal em HPLC, pois pode detetar várias substâncias nomeadamente as que não dão resposta aos detetores de absorvância ou de fluorescência [13]. No entanto, a detecção por índice de refração é limitada uma vez que estes detetores têm baixa sensibilidade, a detecção é sensível às variações de temperatura, pressão e fluxo, e apenas podem ser utilizados para análise isocrática [8].

Através dos detetores mencionados acima apenas é possível detetar os compostos. Acoplando a cromatografia líquida a um espectrómetro de massa (LC-MS) é possível não só detetar mas também identificar os compostos. A acessibilidade e a facilidade de uso estão a tornar o LC-MS uma técnica hifenada cada vez mais prática e usual nos laboratórios [18] [13].

- **Espetrometria de massa (MS)**

A cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS) constitui uma técnica analítica poderosa, uma vez que combina o poder de separação da cromatografia líquida com a capacidade de análise da espetrometria de massa (MS). A MS permite identificar compostos desconhecidos em amostras complexas, elucidar propriedades químicas e estruturais de moléculas ou mesmo confirmar componentes vestigiais nos níveis mais baixos possíveis, através da sua sensibilidade e especificidade [20]. Existem vários tipos de

espetrômetros de massa nomeadamente: setor magnético, quadrupolo único, quadrupolo triplo, gaiola de iões ou de tempo de voo [3].

A Universidade de Coimbra é um dos locais que possui esta técnica hifenada de cromatografia líquida acoplada com MS, no Laboratório de Espetrometria de Massa, que dá suporte técnico e científico para a descoberta e desenvolvimento de compostos bioativo naturais e sintético, estudos de metabolismo de medicamentos, análise de xenobióticos bem como de cosméticos e formas de dosagem. Este espectrómetro de massa é constituído por detetores em tandem, quadruplo/gaiola de iões/quadrupolo, e tem como fonte, ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI) [21].

O UHPLC é uma técnica com alta resolução, sensibilidade e eficiência, e com resultados mais rápidos e menor quantidade de solvente utilizado em comparação com o HPLC. Como na MS apenas são necessárias pequenas quantidades de solvente, a técnica de hifenação fica beneficiada com a utilização do UHPLC uma vez que são utilizados volumes reduzidos de fase móvel podendo a amostra entrar diretamente no espectrómetro de massa. Tal não se verifica com o HPLC pois utiliza volumes maiores e por isso tem que se fazer uma separação da fase móvel, para entra no espectrómetro um volume muito pequeno. Quanto à fase móvel que sai do detetor esta poderá ser enviada para o lixo ou recolhida, conforme o pretendido. Assim é notável que a deteção beneficie com as características de desempenho da tecnologia UHPLC [20].

Para além dos detetores mencionados acima, que são os mais usais, muitos outros são usados em LC nomeadamente os de infravermelho, os de espalhamento de luz ou os de aerossol.

O uso de vários detetores em série é muito benéfico, podendo por exemplo combinar-se o detetor de absorvância UV/Vis com um espectrómetro de massa, permitindo assim obter-se informações mais abrangentes sobre o analito com uma única injeção [13, 18].

Depois, o detetor apropriado envia o sinal elétrico correspondente para a estação de dados no computador gerando-se um cromatograma com os respetivos picos, onde se pode identificar e quantificar a concentração dos analitos da amostra.

7. UHPLC vs HPLC

O HPLC e o UHPLC são técnicas de separação de cromatografia líquida frequentemente usadas em laboratórios. Nos últimos anos tem havido uma tendência de mudar de HPLC para UHPLC, e porquê esta mudança?

Existem algumas diferenças notórias entre o HPLC e o UHPLC esquematizadas na Tabela 2, uma das diferenças mais notórias reside no tamanho das partículas da fase estacionária, que variam entre 2-10 μm no HPLC e em UHPLC as partículas têm 2 μm ou ainda menos [22]. Através da diminuição do tamanho das partículas é possível obter-se uma redução na altura dos pratos teóricos alcançando uma maior eficiência na separação. Com partículas menores e aumentando o fluxo, irá ocorrer uma redução do tempo de análise sem diminuição da resolução, Anexo (Figura A).

Outra alteração reside ainda na pressão em que os sistemas operam. Os instrumentos de HPLC operam normalmente a pressões máximas de 400 bar, enquanto os sistemas de UHPLC operam com pressões superiores, até 1200 bar. Ocorreram alterações também ao nível do tamanho das colunas de UHPLC, uma diminuição tanto ao nível do comprimento como do diâmetro interno [16]. Através destas reduções de tamanhos é possível obter-se picos mais altos e mais estreitos, melhorando a sensibilidade, por conseguinte menos solvente será utilizado tornando-se assim uma tecnologia mais ecológica.

No entanto existe um fator a ter em consideração, que é a contrapressão que se gere devido à redução do tamanho das partículas e do reduzido diâmetro das colunas. Para se controlar essa contrapressão mas também o aumento da pressão verificada, são necessárias bombas e componentes de alto desempenho que estão cada vez mais em força, mas acarretam custos mais elevados [3].

Posto tudo isto é necessário relembrar que o HPLC surgiu primeiro que o UHPLC, tendo a maioria dos métodos sido desenvolvido em HPLC. Transferir-se de HPLC para UHPLC acarreta tempo e recursos, mas como se utilizam volumes reduzidos de solvente, se têm tempos de execução mais rápidos e, por conseguinte, um maior rendimento, o investimento inicial do equipamento será rapidamente compensado, Anexo (Figura A). Para além disso o UHPLC é compatível com altas temperaturas, facilmente se associa a outros métodos e agora é muito mais fácil transferir de HPLC para UHPLC pois existem inúmeras empresas que se dedicam a esta área [15, 22].

Tabela 2 - Principais diferenças entre as técnicas de HPLC e UHPLC.

	HPLC	UHPLC
Tamanho de partículas	2-10 μm	< 2 μm
Dimensões da coluna	5 × 300 mm	3 × 150 mm
Pressão que operam	400 bar	1200 bar
Volume de solvente	50 mL	10 mL
Resolução	Boa	Muito boa
Tempo de análise	Rápido	Muito mais rápido

8. EXEMPLO REAL DAS VANTAGENS AO MUDAR DE HPLC PARA UHPLC:

A companhia farmacêutica da empresa Johnson & Johnson tinha como principal técnica separativa o HPLC tal como a maioria das empresas. Devido ao elevado tempo de análise desta técnica a empresa não conseguia obter a produtividade desejada estando a ficar com problemas económicos.

A mudança era fundamental, e a empresa Johnson & Johnson ao ter conhecimento do sistema ACQUITY UPLC ficou impressionada. Com este sistema poderia economizar 5 L de solvente por dia, mas as vantagens não ficavam por aqui, este sistema tem também a capacidade de realizar o trabalho de três sistemas HPLC, podendo por isso realizar mais análises economizando cerca de três horas por dia.

Assim, ao adquirir este sistema as análises passaram a ser executadas mais rapidamente, com maior resolução e a empresa conseguiu economizar tempo e dinheiro, permitindo introduzir produtos no mercado em menos tempo [23].

9. EMPRESAS/ EQUIPAMENTOS DE REFERÊNCIA PARA UHPLC

9.1 WATERS

A Waters Corporation é uma empresa mundial e foi a pioneira em inovações cromatográficas (UPLC), espectrometria de massa e análise térmica. Possui uma enorme força de trabalho e uma organização diversificada para oferecer benefícios que melhorem a saúde e

o bem-estar humano por meio de inovações. Uma das grandes inovações foi o sistema **ACQUITY UPLC** explicado de seguida e representado na Figura 9.

A tecnologia de UPLC surgiu com o propósito de se alcançarem análises ultra-rápidas, diminuindo o tempo de análises e daí aumentar a produtividade, sem afetar a resolução.

Foi realizado um esforço substancial com o propósito de se produzir um instrumento de LC, capaz de suportar as pressões exercidas pelas partículas pequenas (sub-2 μm) do material de embalagem e minimizar a dispersão do caminho do fluxo de modo a melhorar a eficiência do sistema. De realçar que este instrumento tem que ser confiável, robusto e preciso para o uso laboratorial de rotina.

Através do surgimento do sistema ACQUITY UPLC, representado na Figura 9, foi possível atender a todos os requisitos mencionados com sucesso obtendo-se resultados marcantes. O que realça neste sistema é a partícula química híbrida sub-2 μm patenteada da Waters, tendo benefícios significativos em relação aos sistemas HPLC [5, 17].

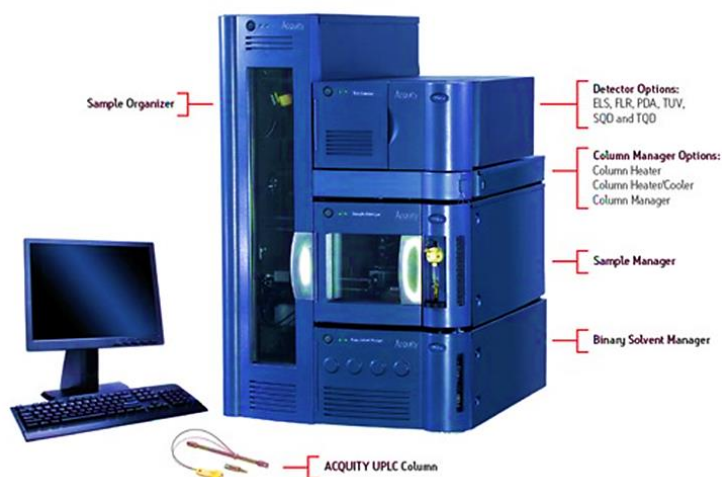


Figura 9 - Sistema ACQUITY UPLC (Adaptado de [24]).

O sistema ACQUITY UPLC pode ser utilizado sozinho ou associado com tecnologias de detecção fornecendo soluções únicas para todas as indústrias. Este sistema é constituído por um conjunto abrangente de componentes, representado na Figura 9, em que um dos componentes é o gerenciador da amostra que tem como objetivo diminuir a distância entre o injetor e a entrada da coluna para se minimizar a propagação da banda. É também constituído por componentes que permitam uma correta adequação às tarefas analíticas específicas, incluindo colunas de 1,7 μm e 1,8 μm bem como pré-colunas VanGuard [24].

No sistema é tido em consideração a tubulação que conecta a saída da coluna e a entrada no detetor uma vez que o diâmetro interno desta tubulação pode ter muito impacto na expansão da banda, sendo possível diminuir a expansão através da diminuição do diâmetro interno. É de igual importância o comprimento da tubulação uma vez que comprimentos

excessivos podem distorcer a banda da amostra devido ao atrito ao longo das paredes sendo preferível colunas mais curtas, tal como ilustrado na Figura 10.

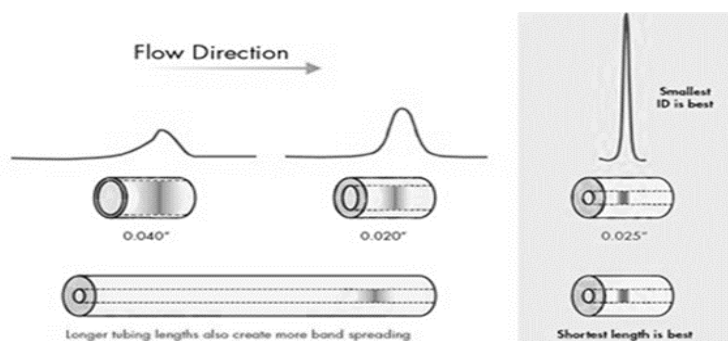


Figura 10 - Representação do espalhamento da banda em função do comprimento e do diâmetro interno da tubulação (Adaptado de [25]).

Esta tecnologia de UPLC permite uma maior eficiência através do uso de partículas mais pequenas (sub-2 μm) pois a eficiência é inversamente proporcional ao tamanho das partículas. Mas para se alcançar ganhos na resolução e na eficiência tem que se ter uma taxa de fluxo ideal que aumenta à medida que o tamanho das partículas diminui, resultando daí uma redução no tempo de análise e na largura do pico.

Através do gráfico ilustrado na Figura 11 é possível observar a influência do tamanho das partículas, ou seja, uma partícula menor tem uma menor altura de pratos teóricos (H), uma faixa de velocidade linear maior, por conseguinte uma maior eficiência e a resolução pode ser alcançada em menor tempo. O tamanho menor de partículas também tem impacto no termo A da equação de Van Deemter pois as moléculas de analito irão percorrer caminhos mais semelhantes originando bandas mais estreitas, maior eficiência e maior sensibilidade. Posto isto, a transferência de massa vai melhorar muito à medida que o tamanho das partículas diminui.

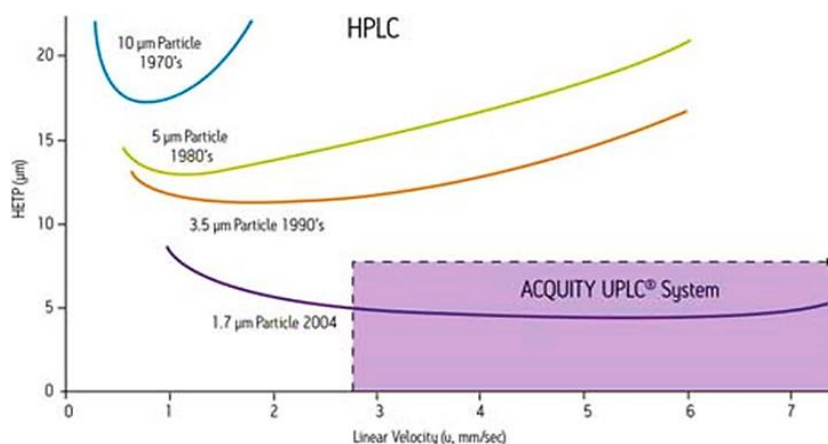


Figura 11 - Comparação das curvas no Gráfico de Van Deemter através da alteração do tamanho das partículas (Adaptado de [26]).

A capacidade do pico é o número de picos teóricos que podem ser separados num determinado tempo, sendo inversamente proporcional à largura do pico. Com este sistema UPLC a capacidade do pico pode ser aumentada drasticamente, podendo aumentar de 70 para 168 picos, permitindo assim obter mais informação por unidade de tempo com alta resolução.

Uma das limitações ao utilizar partículas menores é o aumento das pressões operacionais, que aumentam à medida que se diminui o tamanho das partículas. Os aparelhos convencionais de HPLC tinham limitações para estes aumentos de pressões, mas o sistema ACQUITY UPLC foi projetado com o propósito de poder suportar as elevadas pressões, Anexo (Tabela A), permitindo a utilização com sucesso de partículas de diâmetros inferiores.

Devido às pressões elevadas é necessário aumentar a temperatura, pois à medida que a temperatura aumenta a viscosidade da fase móvel diminui levando a uma menor contrapressão. No entanto tem que se ter em atenção o aumento da temperatura uma vez que pode diminuir a estabilidade do sistema.

O instrumento ACQUITY UPLC possui um volume de sistema cerca de 84% menor e uma expansão de banda cerca de 60% menor em comparação com um instrumento de HPLC. O sistema foi assim projetado para melhorar a qualidade das informações das separações cromatográficas [17, 24].

Resumidamente o Sistema ACQUITY UPLC permite:

- Ganhos de eficiência, sensibilidade e maior resolução com as partículas sub-2 μm ;
- Uma redução no comprimento da coluna reduzindo também o tamanho de partículas, por exemplo, 5 μm para 2 μm , mas com a mesma eficiência;
- Separações eficazes com velocidade de fase móvel maior;
- Um aumento na produção sem perda da resolução;
- Melhorias na informação obtida permitindo analisar mais amostras por unidade de tempo;
- Economizar nos custos de consumo, e beneficia o meio ambiente uma vez que exige quantidades inferiores de solventes;
- Detetar compostos a níveis cada vez menores, uma vez que possui maior sensibilidade, sendo esta capacidade ampliada através da utilização de detetores de dispersão de luz evaporativa ou com detetores de fluorescência [27].

Partículas UPLC Waters

Existem dois tipos principais de partículas da Waters usadas neste sistema UPLC:

- Partícula BEH (Bridged Ethylsiloxane Hybrid)

A partícula BEH é uma partícula híbrida com ponte de etilsiloxano e 1,7 µm. Existe disponível com cinco tipos de ligantes: C8, C18, Shield RP18, Fenil ou HILIC. Como esta partícula é híbrida pode ser utilizada numa ampla gama de pH (pH 1-12) e é um ponto-chave para a resolução, sensibilidade e velocidade da tecnologia UPLC [20].

- Partícula HSS (Sílica de Alta Resistência)

Esta partícula é uma partícula de sílica de alta resistência com diâmetro de 1,8 µm. Não é considerada uma partícula de HPLC uma vez que possui estabilidade mecânica para resistir às altas pressões alcançadas nas separações de UPLC, o que normalmente não se verifica com a maioria das partículas de HPLC [27].

Colunas ACQUITY UPLC e pré-colunas VanGuard

As colunas ACQUITY UPLC e pré-colunas VanGuard são das tecnologias mais avançadas pois permitem separações mais rápidas e com maior resolução através da utilização de pequenas partículas. Projetadas para aplicações com pressões de até 1000 bar proporcionando eficiência, robustez e rendimentos únicos [20, 27].

- Colunas ACQUITY UPLC C18 e C8

Possuem uma ampla faixa de pH sendo a escolha universal para a maioria das separações de UPLC, têm estabilidade tanto para pH baixo como para pH alto. Incorporam alta tecnologia em ligantes (grupos octadecil (C18) e grupos octil (C8)) e as inovações de síntese de partículas permite a produção de picos mais destacados, maior eficiência e o máximo de sensibilidade na espectrometria de massa. Estes ligantes possuem ainda processos de desativação únicos e próprios [5, 17].

- Colunas ACQUITY UPLC BEH Shield RP18

Colunas que incorporam um grupo carbamato integrado ao ligante (Shield RP18). Estes ligantes, patenteados da Waters, demonstraram uma retenção aumentada para compostos fenólicos. Devido ao excelente formato de pico, à boa seletividade combinada com a ampla faixa de pH e a alta eficiência da partícula BEH de 1,7 µm, tornam esta ferramenta ótima para o desenvolvimento do método UPLC [17].

- Colunas ACQUITY UPLC BEH Fenil

Utilizam uma cadeia alquil C6 trifuncional entre o anel de fenil e a funcionalidade do silil. Este ligante também possui processos de desativação próprios proporcionando um excelente formato de pico. Estas colunas possuem uma boa estabilidade e um excelente formato de pico para compostos aromáticos [10, 17].

- Colunas ACQUITY UPLC BEH HILIC (cromatografia de interação hidrofílica)

Colunas que contém partículas BEH de 1,7 µm que não estão ligadas foram projetadas para reter e separar compostos básicos muito polares tais como analgésicos opióides. Estas colunas são produzidas com o propósito de se obterem separações eficientes e reprodutíveis sob condições de UPLC HILIC [17].

- Colunas ACQUITY UPLC HSS C18

São constituídas por uma fase estacionária que apresenta ligantes C18 trifuncionais e processos de *endcapping*, produzindo bons picos para bases em pH neutro e são resistentes à hidrólise, prolongado assim a vida útil das colunas mesmo a pH baixo. Como as partículas HSS são constituídas apenas por sílica a coluna é projetada para trabalhar com condições extremamente ácidas. Assim, o material de embalagem destas colunas é dos mais estáveis e não apresenta problemas de formação de picos em pH baixo sendo resistentes a hidrólise ácida do ligante a pH baixo [27].

- Colunas ACQUITY UPLC HSS C18 SB

Utilizadas para separações a pH baixo, contêm misturas complexas de compostos básicos e não básicos. Produzem separações diferentes da maioria das fases estacionárias C18 em termos de seletividade, porque a Waters desenvolveu um ligante trifuncional C18 com uma densidade intermédia e sem *endcapping* (SB). Esta diferença dá-se porque os grupos silanol promovem maior retenção dos compostos enquanto a densidade intermediária do C18 promoverá uma menor retenção para os compostos não básicos. Esta combinação única é ideal para um método prático de separações complexas em UPLC [27].

- Colunas ACQUITY UPLC HSS T3

Possuem uma nova tecnologia ao nível dos ligantes, ligantes T3, em que se utiliza uma fase alquil C18 trifuncional com uma densidade de ligantes que irá promover a retenção de compostos polares tendo alta compatibilidade com a fase móvel aquosa. A desativação deste ligante T3 é muito eficaz levando à melhoria do desempenho, do formato do pico bem como da vida útil e da estabilidade da coluna. Ideais para a retenção de compostos polares.

As colunas ACQUITY UPLC HSS são constituídas pela primeira e única partícula 100% de sílica (HSS) que foi projetada para aplicações até 1000 bar [27].

Em suma, as colunas constituídas pelas partículas BEH, que são partículas sólidas e eficientes, fornecem uma ampla faixa de pH e um bom formato de picos mas a natureza da partícula não permite a retenção de compostos polares. As colunas ACQUITY UPLC HSS T3 já foram projetadas para reter compostos orgânicos polares e em comparação com as colunas ACQUITY UPLC BEH C18 também retêm mais fortemente a maioria dos compostos.

- Pré-colunas VanGuard

Com vários anos de desenvolvimento, são os primeiros dispositivos projetadas para proteger eficientemente a coluna de UPLC através do uso rotineiro com pressões até 1000 bar. As pré-colunas apresentam dimensões de 2,1 × 5 mm de comprimento e possuem um volume muito baixo. São constituídas pela mesma fase estacionária que a coluna conectando diretamente com a entrada desta, minimizando volumes extra-coluna bem como vazamentos da fase móvel devido à eliminação de conexões adicionais. Assim a grande função das pré-colunas VanGuard é proteger e prolongar o desempenho da coluna do sistema ACQUITY UHPLC [17, 27].

9.2 THERMO FISHER SCIENTIFIC

Thermo Fisher Scientific é líder mundial em serviços científicos empenhada para melhorar o mundo proporcionando tecnologia inovadora, instrumentos de cromatografia, soluções de *software* e colunas para obter uma solução completa de trabalho.

Os sistemas de HPLC e UHPLC da Thermo Scientific Vanquish são dos instrumentos de LC mais avançados criados para melhorar a produtividade sendo dos sistemas que operam a pressões mais elevadas (1500 bar), Anexo (Tabela A).

Estes sistemas são projetados em torno das colunas sendo a família de colunas de UHPLC Thermo Scientific uma garantia para excelentes separações cromatográficas. Também as válvulas Vanquish UHPLC são biocompatíveis, têm uma vida útil longa e uma baixa manutenção para fazer funcionar o UHPLC de forma rotineira e robusta [24].

A Thermo Scientific proporciona soluções e combinações únicas para os desafios atuais de forma a obter maior produtividade. Criou o sistema **UHPLC Thermo Scientific Vanquish Duo** que se divide em três tipos consoante a necessidade, sistema Vanquish Duo

LC em tandem, sistema Vanquish Duo para LC duplo e sistema Vanquish Duo para gradiente inverso:

- Sistema Vanquish Duo LC em tandem que divide a análise entre duas bombas e duas colunas, em que uma bomba fornece o gradiente analítico e a segunda recupera o gradiente. Esta configuração permite usar duas colunas idênticas para uma execução mais rápida.

- Sistema Vanquish Duo para LC duplo permite executar diferentes métodos simultaneamente num único instrumento, aprofundando o conhecimento da amostra enquanto se maximiza a produtividade e desempenho. Foi construído para utilizar uma ampla variedade de detetores analíticos.

- Sistema Vanquish Duo para gradiente inverso fornece uma resposta uniforme para todos os analitos detetáveis com a detecção aerossol com carga superior. Através do gradiente inverso o eluente entra no detetor sempre com a mesma composição fornecendo assim respostas consistentes com alta confiança [28, 29].

Outro dos grandes projetos da Thermo Fisher Scientific foi o sistema **UHPLC Thermo Scientific Vanquish Horizon**, projetado com tecnologia inovadora e de ponta de forma a proporcionar melhores separações e mais resultados em UHPLC.

Este sistema biocompatível manipula as amostras com alta precisão e uma dosagem das mesmas inigualável. Possui alta capacidade de amostras para fluxos de trabalho de alto rendimento, possuindo uma capacidade de 208 amostras podendo aumentar a capacidade adicionando um carregador opcional. Tem a possibilidade de combinação até nove solventes diferentes sem ter de interromper a análise para os substituir, garante ainda uma temperatura uniforme durante todo o processo e uma refrigeração inovadora da corrente de ar para máxima integridade da amostra. Através de um pré-aquecimento ativo do solvente garante que este entre na coluna à mesma temperatura da mencionada evitando assim perdas de desempenho [30].

O sistema é composto pela coluna UHPLC Thermo Scientific Accucore Vanquish C18, coluna esta produzida através de tecnologia avançada sendo constituída por partículas de 1,5 µm, tendo caminhos de difusão ultracurtos que resultam em separações extremamente eficiente. Pode funcionar numa faixa de temperatura entre 5°C e 120°C [30].

Os sistemas mencionados anteriormente são impulsionados pelo *software* - Thermo Scientific Chromeleon Chromatography Data System (CDS), o mais recente sistema de dados de cromatografia. Este sistema efetua operações de cromatografia e espectrometria de massa desde a pesquisa aos testes de rotina. Oferece ferramentas de automação para controlo do instrumento, garante a qualidade dos dados, e gere o processo analítico desde o

armazenamento, ao processamento dos dados, até à obtenção dos resultados finais. Permite ainda a conexão entre pessoas e instrumentos sendo de fácil utilização, tendo sido projetado para se obterem resultados mais assertivos proporcionando ganhos comprovados de produtividade [31].

9.3 AGILENT

A Agilent é uma empresa que fornece aos laboratórios em todo mundo instrumentos, serviços bem como conhecimentos. Possui um dos maiores portfólios de soluções para atender às indústrias farmacêuticas fornecendo respostas para a descoberta de medicamentos, para o fabrico e para o controlo da qualidade dos mesmos.

Esta empresa criou a série InfinityLab que oferece soluções para HPLC e para UHPLC que incluem colunas e instrumentos, tanto para análise de rotina como para análise de ponta, de forma a poder obter-se a maior eficiência operacional em laboratório.

Criou o sistema **LC 1290 Infinity II**, representado na Figura 12, para ser um sistema UHPLC de última geração com um único caminho de fluxo, melhor desempenho e uma menor dispersão para utilização em UHPLC [32].



Figura 12 - Sistema LC 1290 Infinity II com ISET (Adaptado de [19]).

O sistema LC 1290 Infinity é o sistema mais poderoso e mais adaptável para se poder lidar com a maior variedade de aplicações. Possui uma ampla faixa de potência, temperatura, sistema de injeção fracionado automaticamente e opções de gradiente. Tem opções de

bombas binárias e quaternárias, Anexo (Tabela A), e possui no caminho do fluxo componentes especialmente projetados para se obter a menor dispersão no sistema.

É líder no mercado ao nível da capacidade de amostras, sendo possível fazer o *screening* de mais de 1300 conjuntos diferentes de condições de separação, com até 26 solventes e 8 colunas, em pressões até 1300 bar. Os seus ciclos de injeção são mais rápidos devido à injeção de agulha dupla obtendo maior rendimento da amostra [32].

A transferência de um método em LC não é fácil pois existem diferenças nos *designs* entre os instrumentos que podem afetar a capacidade de transferência, tais como: a potência, o comportamento da mistura ou o *design* da célula detetora. A adaptabilidade do sistema LC 1290 Infinity deve-se à tecnologia de emulação de sistema inteligente (ISET), através do sistema Agilent 1290 Infinity LC com ISET é possível a transferência contínua de métodos entre LC. O sistema Agilent 1290 Infinity LC com ISET pode ser considerado um sistema universal sendo que devido a esta junção é possível executar qualquer método através de métodos existentes, de HPLC e UHPLC sem ter que os modificar, alcançando os mesmos tempos de retenção e de resolução de picos [19].

Para a obtenção de uma maior capacidade de pico e para separações desafiadoras pode alternar-se entre o UHPLC de ponta única e o poder cromatográfico definitivo de 2D-LC [19].

A cromatografia 2D-LC é uma LC Bidimensional que consiste na transferência seletiva de uma ou várias frações da coluna cromatográfica para outra coluna cromatográfica secundária com o propósito de uma separação adicional. Através desta LC Bidimensional é possível melhorar a resolução de uma mistura complexa que não era possível separar numa única coluna, é também útil na limpeza de amostras através da remoção da matriz ou de compostos interferentes podendo aumentar a produtividade das amostras [33].

Colunas Agilent

A Agilent possui uma ampla gama de colunas e a sua escolha baseia-se essencialmente no analito que se pretende analisar e na fase móvel.

Como nas últimas décadas tem ocorrido um forte crescimento na eficiência e na velocidade da cromatografia foram projetadas as colunas Poroshell e Zorbax para análises de alta produtividade. Estas colunas possuem uma ampla gama de fases e configurações conforme as necessidades, flexibilidade e escalabilidade, têm ainda um desempenho imbatível uma vez que a sílica base usada nestas colunas é ultrapura, muito forte e altamente uniforme para uma máxima confiabilidade [34].

- Colunas Poroshell 120

Colunas que possuem partículas de 2,7 µm com um núcleo sólido de 1,7 µm e uma camada porosa de 0,5 µm. Este tamanho de partículas oferece alta eficiência e alta resolução, semelhante às colunas sub-2 µm.

Estas colunas são projetadas para se obter uma reprodutibilidade excepcional, podendo mesmo usar-se várias colunas para se obter a mais alta eficiência e resolução possível. Suportam altas pressões podendo ser usadas em qualquer tipo de LC.

- Colunas Zorbax Alta definição de resolução rápida (RRHD) 1,8 µm

São colunas de alta pressão para ótimos resultados no sistema LC 1290 Infinity ou mesmo noutros instrumentos de UHPLC pois possuem um sistema de empacotamento aprimorado para ter estabilidade até 1200 bar. As partículas de 1,8 µm proporcionam uma ótima resolução para separações mais definidas e possuem uma ampla gama de fases ligadas.

Ao usar a coluna RRHD é possível melhorar a resolução em análises difíceis, permitindo economizar tempo usando colunas mais curtas sem comprometer o desempenho [34].

A Agilent possui ainda biocolunas, que são colunas de cromatografia líquida usadas para a separação de compostos biológicos. Estas colunas possuem assim medidas de poros maiores para poder acomodar tamanhos moleculares maiores. São projetadas para minimizar ligações não específicas do analito de forma a melhorar a sua recuperação e a sua separação de forma a reter-se a função biológica.

Para a separação destas biomoléculas a Agilent usa as funcionalidades de fase reversa, exclusão de tamanhos, troca iónica e afinidade.

O UHPLC aceita para separações de moléculas de tamanho pequeno a médio foi ampliado para grandes biomoléculas através da introdução de meios cromatográficos de poro grande, em colunas que podem suportar pressões até 1200 bar.

- Colunas de sílica ZORBAX com poro de 300 Å

São um dos exemplos de biocolunas que executam uma separação em fase reversa de biomoléculas tendo disponíveis seis fases. Para separações de UHPLC têm opção de tamanho de partículas de 1,8 µm que suportam pressões até 1200 bar devido aos processos de empacotamento aprimorado [34].

10. CONCLUSÃO

A cromatografia é uma das técnicas analíticas mais importantes tendo vindo a pronunciando-se cada vez mais. O número de amostras para analisar é cada vez maior e estas são cada vez mais complexas, a eficiência limitada e a velocidade reduzida do HPLC não estavam a acompanhar as exigências tendo sido fundamental o surgimento do UHPLC.

O aparecimento do UHPLC foi um grande salto ao nível tecnológico existindo inúmeras empresas que se dedicam a esta tecnologia, para construírem um futuro melhor e mais promissor. Trabalham com o intuito de melhorar este sistema, algumas mais focadas ao nível do software para a transferência dos métodos (HPLC para UHPLC) como a Agilent, outras mais empenhadas com as colunas e o seu revestimento, como a Waters. Têm trabalhado sobretudo na evolução das partículas de revestimento e na evolução das colunas, pensando sempre em projetar aparelhos capazes de suportar as elevadas pressões existindo já um aparelho que suporta pressões até 1500 bar, elaborado pela Thermo Fisher. Também têm sido projetados vários detetores para serem capazes de responder às elevadas velocidades do sistema.

Este sistema acoplado à espectrometria de massa constitui uma técnica de topo, pois permite a separação bem como a identificação dos compostos e, como o sistema UHPLC utiliza pequenas quantidades de solvente permite que este entre diretamente no espectrómetro sem ser necessário separar ou descartar solvente.

Vendo as inúmeras hipóteses disponíveis para se adquirir um sistema UHPLC e as suas vantagens, podemos mesmo dizer que “um pequeno passo para o um homem, mas um salto gigante para a humanidade”, pois com o sistema mais apropriado e uma seleção adequada da fase móvel e da fase estacionária pode alcançar-se uma ótima separação.

Não esquecendo que a maioria dos laboratórios possui sistemas de HPLC, alterar para um sistema de UHPLC acarreta tempo e custos. Contudo esta transferência é cada vez mais fácil e o investimento é facilmente recuperado, uma vez que a diminuição do tamanho das partículas e das colunas permite análises muito mais rápidas e uma grande redução na quantidade de solventes gastos. Posto isto, esta técnica permite economizar muito, tanto em custos de consumo como em tempo e é uma tecnologia ecológica uma vez que necessita de reduzidas quantidades de solvente.

Assim, os laboratórios devem pensar em investir no presente para um futuro melhor.

11. BIBLIOGRAFIA

1. ETTRE, L. S. - **Chapters in the Evolution of Chromatography**. London: Imperial College Press, (2008). ISBN 9781860949432.
2. LAYLIN, J. K. - **Nobel Laureates in Chemistry, 1901-1992**. Universidade de Michigan: Wiley, (1993). ISBN 9780841224599.
3. HAGE, D. S. - Chromatography. In **Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry**. Amsterdam: Elsevier, (2018). ISBN 9780128160633. cap 1, p. 1-31.
4. MEYER, V. R. - CHROMATOGRAPHY | Principles. In **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, (2013). ISBN 9780124095472. p. 105-112.
5. SIDDHANT, M.; SMITA, G.; VAISHALI, J.; ASHISH, J. - **HPLC – High Performance Liquid Chromatography & UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatographic System – A review on modern liquid chromatography**. Indo American Journal OF Pharmaceutical Sciences, 5 (2018) 7590-7602.
6. CÂMARA, B. - **HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência | Biomedicina Padrão**. Biomedicina, Padrão, (2014). [Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2015/04/hplc-cromatografia-liquida-de-alta.html>
7. DOLAN, J. W. - **How Does It Work? Part I: Pumps**. LGGC North America, 34 (2016) 324-329.
8. LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BORRÁS-LINARES, I.; SASS-KISS, A.; SEGURA-CARRETERO, A. - Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In **Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)**. London: Academic Press, (2018). ISBN 9780128142646. cap 13, p. 459-474.
9. FCTUC - **Portal de Engenharia Química**. [Acedido a 16-02-2020]. Disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/site/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=451%3E;
10. KUMAR, A.; SAINI, G.; NAIR, A.; SHARMA, R. - **UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis**. Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research, 69 (2012) 371-380.

11. MCNAIR, H. - **The Van Deemter Equation**. Chromedia Analytical Sciences, (2020). [Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=wnjedDsHiemBpdmBIIcCIBiF>
12. CHROMACADEMY - **HPLC: Chromatographic Parameters**, (2014).[Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/?channel=1178>
13. LACOURSE, W. R. - HPLC Instrumentation. In **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, (2017). ISBN 9780124095472. p. 1-7.
14. SWARTZ, M. E.; MURPHY, B. - **New Frontiers in Chromatography**. American Laboratory, (2005). [Acedido a Disponível em: <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19157-New-Frontiers-in-Chromatography/>
15. DONG, M. W.; ZHANG, K. - **Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development**. Trends in Analytical Chemistry, 63 (2014) 21-30.
16. NOVÁKOVÁ, L.; SVOBODA, P.; PAVLÍK, J. - Ultra-high performance liquid chromatography. In **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation**. Second Edi. Amsterdam: Elsevier, 2017. ISBN 9780128053935. cap 29, p. 719-769.
17. WATERS - **Ultra Performance LC Technology, Separation Science Redefined**. 2005,[Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001136en.pdf>
18. WATERS - **How Does High Performance Liquid Chromatography Work?** [Acedido a 06-04-2020]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT
19. AGILENT - **Transferência de método Infinitamente melhor 1290**. (2011),[Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-8670PTBR.pdf>
20. RATHOD, R. H.; CHAUDHARI, S. R.; PATIL, A. S.; SHIRKHEDKAR, A. A. - **Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in**

- practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations.** Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 5 (2019) 1-26.
21. FFUC - **Laboratório de Espectrometria de Mass (LEM/UC).** [Acedido a 24-05-2020]. Disponível em: https://www.uc.pt/ffuc/cef/services_and_cores/lem
 22. CROSS, T. - **HPLC or UHPLC?** ThermoScientific, (2019). [Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://analyteguru.com/hplc-or-uhplc/>
 23. FOLEY, W.; GILDEA, B.; WHEAT, T. E. - **The missing link between HPLC and UPLC technology.** American Laboratory, (2015). [Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/457-The-Missing-Link-Between-HPLC-and-UPLC-Technology/>
 24. WATERS - **UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography Beginner's Guide.** [Acedido a 13/04/2020]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_PT/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=167
 25. WATERS - **Bands, Peaks and Band Spreading.** [Acedido a 26/07/2020]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_PT/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?cid=134803614&locale=167
 26. WATERS - **Solvents and Caveats for LC/MS.** [Acedido a 26/07/2020]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/en_GB/Solvents-and-Caveats-for-LC-MS/nav.htm?locale=en_GB&cid=10091173
 27. WATERS - **Colunas ACQUITY UPLC.** [Acedido a 24-04-2020]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/pt_PT/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=167&cid=513206
 28. THERMOFISHER - **Vanquish Duo UHPLC Systems Three workflows . Two flow paths . One integrated solution.** [Acedido a 28-05-2020]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/products-and-services/promotions/industrial/gain-productivity-dual-liquid-chromatography-system.html>
 29. THERMOFISHER - **HPLC and UHPLC Systems.** [Acedido a 02-03-2020]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc/hplc-uhplc-systems.html?gclid=EAlaIQobChMik5-ex>

f85wIVScjeCh0NZAC2EAAYASAAEgK8b_D_BwE&ce=E.20CMD.DLI02.29343.01&c
id=E.20CMD.DLI02.29343.01&ef_id=EA1aIQobChMlk5-ex-f

30. THERMOFISHER - **Accucore™ Vanquish™ C18+ UHPLC Columns, 1.5µm.** [Acedido a 12-07-2020]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/27101-052130#/27101-052130>
31. THERMOFISHER - **Vanquish™ Horizon UHPLC System, Integrated biocompatible system.** [Acedido a 12-07-2020]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAAGABHFAPUMZZZ#/IQLAAAGABHFAPUMZZZ>
32. AGILENT - **1290 Infinity II LC System.** [Acedido a 05/05/2020]. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/analytical-hplc-systems/1290-infinity-ii-lc-system#systemcomponents>
33. HOLCAPEK, M.; BYRDWELL, W. C. - Introduction to Two-Dimensional Liquid Chromatography—Theory and Practice. In **Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques**. London: AOCS Press, (2017). ISBN 9780128117323. cap 7, p. 227-286.
34. AGILENT - **LC e LC / MS Seu recurso essencial para colunas e consumíveis LC E LC / MS Maximize o desempenho do sistema,** (2013).[Acedido a 22/07/2020]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5991-1059PTBR.pdf>

12. ANEXOS

Tabela A - Principais instrumentos de UHPLC disponíveis e as suas características (Adaptado de [13]).

Instrument Name	Introduction on Market	Maximum Back-pressure bar	Flow Rate (mL/min)	Temperature Capability (°C)	Injection Volume (µL)	Dead Volume (µL)	Injection Time (s)	Maximum Acquisition Rate (Hz)	Available Detector	Vendor
Acquity UPLC	2004	1000	0.01 – 2.00	Up to 90	0.1 – 250	120	15	80	UV, PDA, RI, FLD, ELSD, MS	Waters
1200 RRLC	2006	600	Up to 5	Up to 100	0.1 – 100	260	<30	80		Agilent
Prominence UFLC (current name: Nexera XF)	2007	660	Up to 3 (660 bar) Up to 5 (440 bar)	Ambient t – 10 – 85 Ambient t +5 – 150 ^o	0.1 – 50 (extension up to 0.1 – 2000)	175 (without mixer) 215 (with 40µL mixer)	20	100	UV/VIS, PDA, FLD, RI, ELSD, ECD, MS, MS/MS	Shimadzu
UltiMate 3000 RSLC	2008	800	0.05 – 5	5 – 110	0.01 – 500	35	15	100		Dionex
PLATINBlue	2008	1000	0.01 – 2.5 (800 bar)	10 – 140	1 – 5000	110	15	200	DAD, UV	Knauer
Infinity	2009	1200	Up to 5	Up to 100	0.1 – 100	55 – 110	<19	160		Agilent
1290 Infinity BP	2009	1200	0.2 – 5	0 – 100	0.1 – 20	55 – 110	<21	160	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
Flexar (FX-15)	2009	1240	0.001 – 5	4 – 90	0.1 – 2450	<150	8	100	PDA, UV/VIS, FL, RI	Perkin Elmer
1220 Infinity BP (low pressure mixing)	2010	600	0.2 – 10	0 – 80	0.1 – 100	600–800	<50	80	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
1260 Infinity BP	2010	600	0.2 – 5	0 – 80	0.1 – 100	260	<21	80	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
1260 Infinity QP	2010	600	0.2 – 10	0 – 80	0.1 – 100	600 – 800	<50	80	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
Acquity UPLC H-Class	2010	1000	0.01 – 2.00	Up to 90	0.1 – 1000	400	30	80	UV, PDA, RI, FLD, ELSD, MS	Waters
UltiMate 3000 RSLC	2010	1034	0.05 – 8	5 – 110	0.01 – 100	35	15	200	DAD, UV, FLD, RI, CAD, ECD, MS	Thermo-Dionex
Acquity UPLC I-Class	2011	1200	0.01 – 2.00	Up to 90	0.1 – 1000	100	15/30	80	UV, PDA, RI, FLD, ELSD, MS	Waters
1290 Infinity II BP	2014	1300	0.001 – 5	0 – 110	0.1 – 120	<45 (10 µL without mixer)	<10	240	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
1290 Infinity II QP	2014	1300	0.001 – 5	0 – 110	0.1 – 120	<350	<10	240	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
Acquity UPLC M-Class	2014	1000	0.01 – 100	Up to 90	0.1 – 100	1	15	80	UV, PDA, MS	Waters
Altus A-30	2015	1030	0.01 – 2.2	4 – 40	0.1 – 10	<400 (total system)	<30	80	PDA, UV/VIS, FL, MS, MS/MS	Perkin Elmer
Azura UHPLC	2015	1000	Up to 2 (1000 bar) Up to 5 (700 bar)	5 – 85	0.1 – 5000	120 (binary gradient)	7	100	DAD, UV, RI	Knauer
Vanquish	2015	1510	0.001 – 5	5 – 120	0.01 – 100	25	8	200	DAD, UV, FLD, CAD, MS	Thermo-Dionex
1260 Infinity II BP	2016	600	0.2 – 10	0 – 85	0.1–120	<120	<10	120	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent
1260 Infinity II QP	2016	600	0.2 – 10	0 – 85	0.1–120	600–800	<10	120	UV-Vis, DAD, FLD, RID, ELSD, MS	Agilent

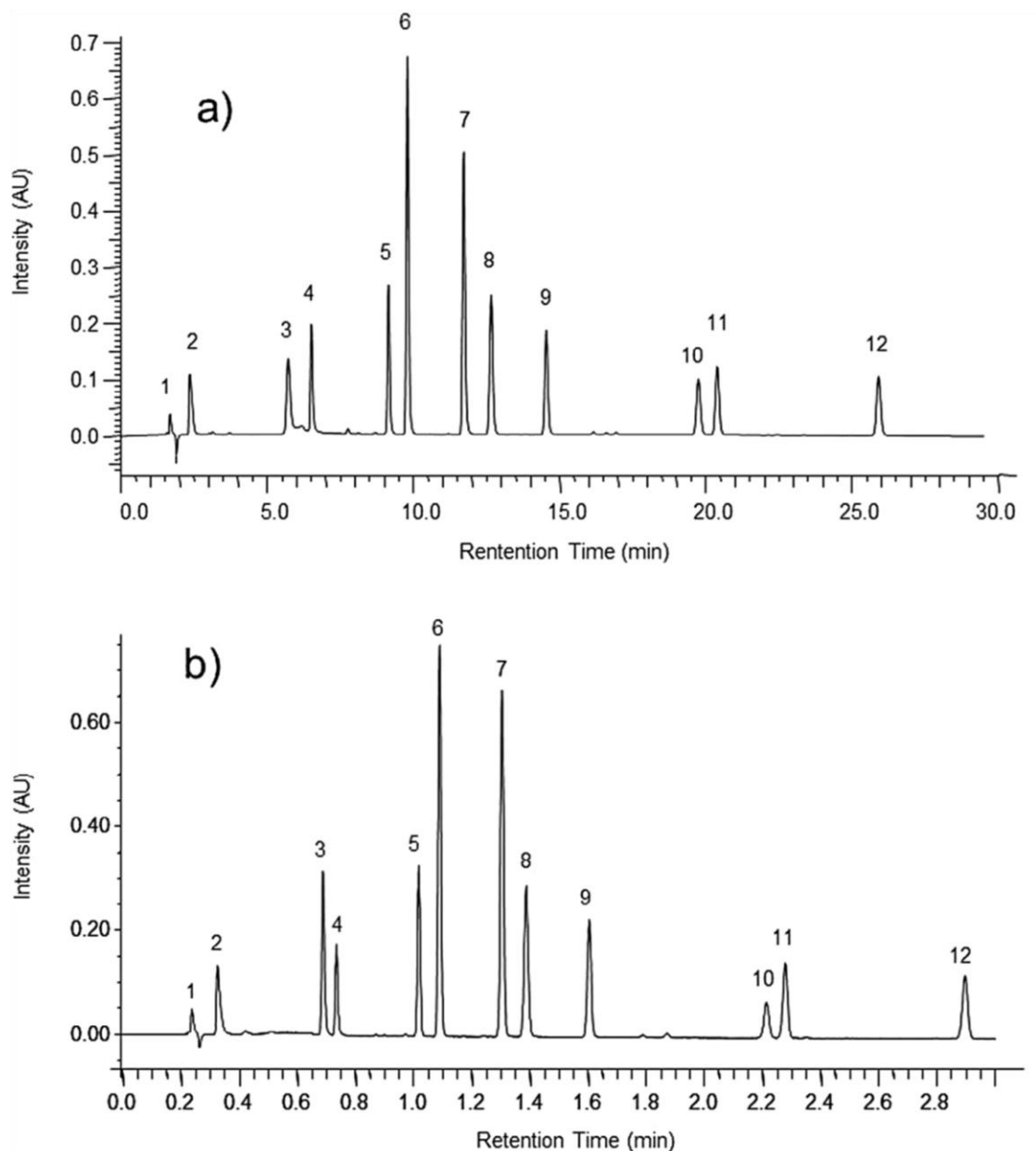


Figura A - Exemplo da análise de uma formulação farmacêutica usando tanto o método de HPLC (a) com o UHPLC (b). Pico 6 correspondente à substância ativa e os restantes picos a impurezas esperadas. Condições em HPLC (a): Coluna C18 150×4,6 mm, partículas de fase estacionária 5 µm, fluxo de 1 mL/ min., Volume de injeção de 20 µL e tempo total de execução 30 minutos. Condições em UHPLC (b): Coluna C18 50×2,1 mm, partículas de fase estacionária 1,7 µm, fluxo de 0,6 mL/min, Volume de injeção de 1,4 µL e tempo total de execução 3,1 minutos (Adaptado de [3]).