



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

LUCIANA GURGEL FRANCO

CROMATOGRAFIA VERDE

BAURU

2015

LUCIANA GURGEL FRANCO

## CROMATOGRAFIA VERDE

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Licenciada em Química pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Bauru.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

BAURU

2015

Franco, Luciana Gurgel.  
Cromatografia Verde/ Luciana Gurgel Franco, 2015  
37 f. : il.

Orientador: Daniel Rinaldo.

Monografia (Graduação)-Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2015.

1. Química Verde. 2. Cromatografia Verde. 3.  
Sustentabilidade. I. Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Ciências. II.  
Cromatografia Verde.

LUCIANA GURGEL FRANCO

**CROMATOGRAFIA VERDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus de Bauru, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Licenciado em Química.

**Aprovado em 01 de Abril de 2015.**

**Banca Examinadora**



Professor Doutor Daniel Rinaldo.

Universidade Estadual Paulista



Professor Doutor Mário Sergio Galhiane.

Universidade Estadual Paulista



Professor Doutor Marcos Vinícius Almeida.

Universidade Estadual Paulista

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu Guia e Amigo, estando ao meu lado em todos os momentos.
- Aos meus pais, Francisco e Maria Helena, pelo amor e apoio incondicional. Sem vocês eu não seria nada.
- À minha amiga e irmã, Andresa, por ter sido um exemplo de dedicação, determinação, alegria, e principalmente fidelidade a Deus. Mesmo não estando mais entre nós, você morará sempre em meu coração.
- Às minhas amigas de Graduação Samara, Gislaine e Michele, por toda amizade e carinho que perdura até hoje, mesmo na distância.
- À UNESP, por ter sido a instituição de ensino que me possibilitou o acesso ao melhor ensino que eu poderia ter.
- Aos meus professores, por me transmitirem o conhecimento, principalmente àqueles que demonstraram carinho e compreensão quando se fez necessário.
- À minha amiga Juliety Kelly, Milene e Melina pela paciência que tiveram comigo durante o último semestre da faculdade, em especial na realização desse trabalho. Obrigada por todo apoio e motivação. Por acreditarem em mim.
- Ao meu orientador Daniel, por ter aceitado me orientar nesse trabalho.
- A todos aqueles que de uma maneira ou de outra me ajudaram nesse período de Graduação.

## **RESUMO**

Sustentabilidade é a capacidade do ser humano interagir com o mundo, preservando o meio ambiente para não comprometer os recursos naturais das gerações futuras. Esse é o principal objetivo da Química Verde, a qual está fundamentada em doze princípios básicos. Uma de suas ramificações, a Química Analítica Verde, aplica os doze princípios em suas técnicas, como a Cromatografia Verde. O objetivo desse trabalho foi realizar uma breve revisão bibliográfica sobre como algumas técnicas cromatográficas (Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Líquida a Alta Temperatura, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, Micro Cromatografia Líquida e Cromatografia Super Crítica) podem tornar-se menos nocivas ao meio ambiente.

Palavras chave: Química Verde, Cromatografia Verde, Sustentabilidade.

## **ABSTRACT**

Sustainability is the ability of human beings interact with the world, preserving the environment to not compromise the natural resources of future generations. This is the main goal of Green Chemistry, which is based on twelve basic principles. One of its branches, the Green Analytical Chemistry, apply these principles in their techniques, such as Green Chromatography. The aim of this study was to do a brief literature review on some chromatographic techniques (Gas Chromatography, High Performance Liquid Chromatography, High Temperature Liquid Chromatography, Ultra Pressure Liquid Chromatograph, Micro Liquid Chromatography and Super Critical Chromatography) and measure their impact on the environment.

Keywords: Green Chemistry. Green Chromatography. Sustainability.

## SUMARIO

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                | <b>8</b>  |
| <b>2. CROMATOGRAFIA GASOSA.....</b>                      | <b>16</b> |
| <b>3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....</b> | <b>19</b> |
| <b>3.1. SUBSTITUIÇÃO DE SOLVENTES</b>                    |           |
| 3.1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A ALTA TEMPERATURA.....     | 22        |
| <b>3.2. REDUÇÃO DE RESÍDUOS</b>                          |           |
| 3.2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.....    | 24        |
| 3.2.2. MICRO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....                  | 27        |
| 3.2.3. CROMATOGRAFIA SUPERCRÍTICA.....                   | 29        |
| <b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                      | <b>34</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                | <b>36</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

Uma abordagem mais atual envolve a aplicação da cromatografia com conceitos de química verde, conhecida como “cromatografia verde”.

Química verde, limpa, benigna; são termos diferentes que trazem a ideia de tornar possível a química menos agressiva ambientalmente. Nos leva àqueles conceitos de prevenção e sustentabilidade que tanto se ouve falar, os quais, estão cada vez mais presentes na realidade industrial mundial. Tem como objetivo minimizar o consumo de reagentes e energia, bem como a geração de resíduos na indústria química. Mais do que isso, substituir o que é prejudicial por algo inofensivo.

Os produtos ou processos da química verde podem ser divididos em três grandes categorias:

1. O uso de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima;
2. Aumento da eficiência de energia, ou a utilização de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produtos;
3. Evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas.

O conceito “química verde” foi introduzido por Paul T. Anastas e John Warner. (ANASTAS; WARNER, 1998). Eles estabeleceram os doze princípios básicos da Química Verde, os quais estão listados abaixo:

1. Prevenção: Evitar a produção de resíduo é melhor do que tratá-lo ou limpá-lo, após sua geração.
2. Economia de Átomos: Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.

3. Síntese de Produtos Menos Perigosos: Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente.

4. Desenho de Produtos Seguros: Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.

5. Solventes e Auxiliares mais Seguros: O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, essas substâncias devem ser inócuas.

6. Busca pela Eficiência de Energia: A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.

7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria Prima: Sempre que técnica – e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não-renováveis.

8. Evitar a Formação de Derivados: A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque essas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.

9. Catálise: Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.

10. Desenho para a Degradação: Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final da sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.

11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição: Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes: As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Química Verde é um campo relativamente novo emergente que se esforça para trabalhar no nível molecular visando alcançar a sustentabilidade. O campo tem recebido grande interesse na última década, devido à sua capacidade de aproveitar a inovação química para atender aos objetivos ambientais e econômicos ao mesmo tempo.

O aspecto mais importante da Química Verde é o conceito de *design*. O *design* é uma declaração de intenção humana e não se pode fazer o projeto por acidente. Inclui novidade, planejamento e concepção sistemática. Os doze princípios da Química Verde são " regras de *design*" para ajudar os químicos a atingirem o objetivo intencional de sustentabilidade. Química Verde é caracterizada por um planejamento cuidadoso de síntese química e *design* molecular para reduzir consequências adversas (ANASTAS, EGHBALI, 2010).

O conceito de Química Verde tem tido este grande impacto devido ao fato de que ele vai além da pesquisa laboratorial; tocou a indústria, educação, meio ambiente, e o público em geral. O campo da Química Verde tem demonstrado como os químicos podem projetar para essa e para as próximas gerações, processos para que eles sejam rentáveis ao mesmo tempo bons para a saúde humana e o meio ambiente. Seguindo o entusiasmo científico de Química Verde, as iniciativas de ensino, financiamento governamental, o estabelecimento de Centros de investigação de química verde têm se multiplicado nas duas últimas décadas. Muitas universidades já oferecem aulas em Química Verde e Engenharia Verde. Algumas instituições oferecem diplomas na área. O financiamento governamental também aumentou em vários países ao redor do mundo.

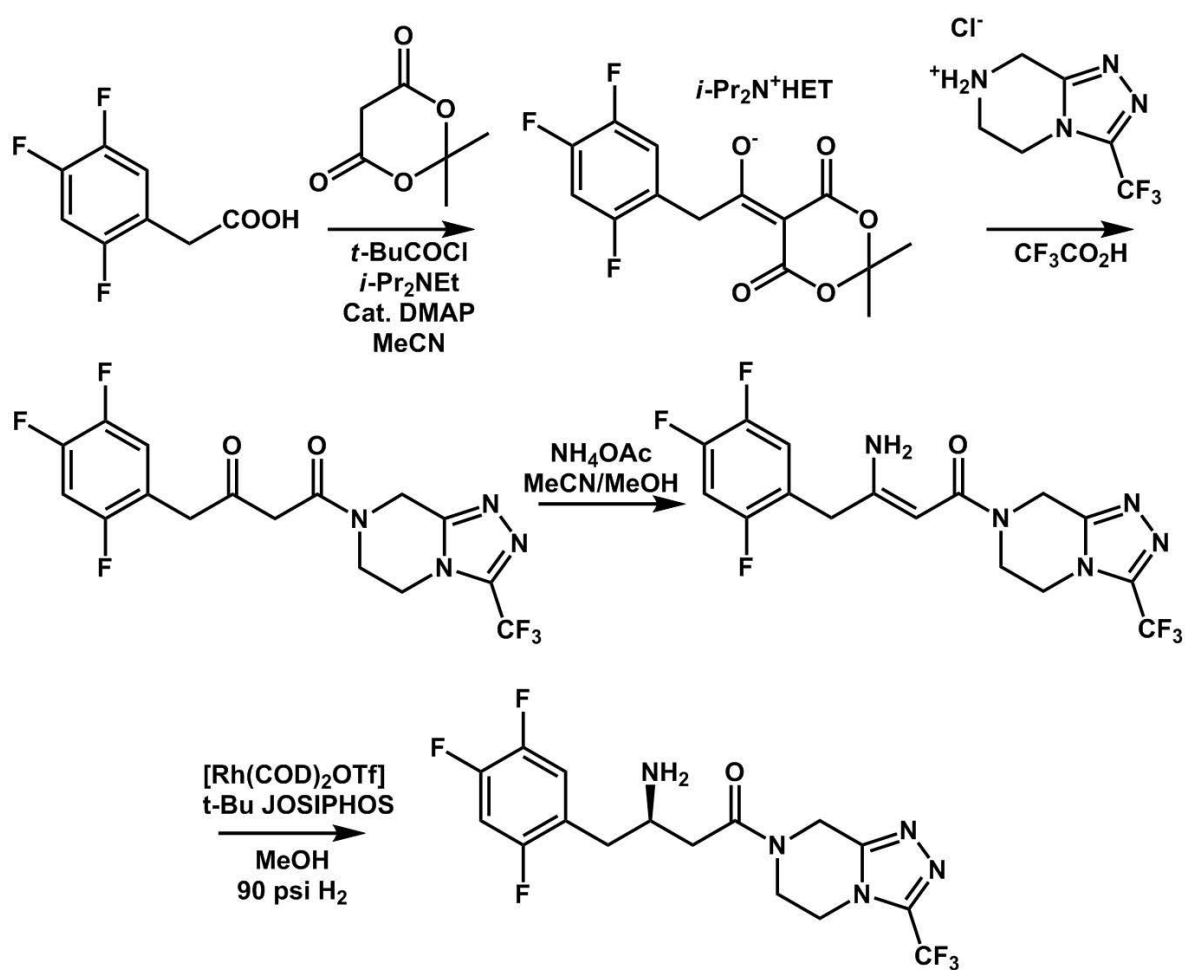
Embora tenha havido foco significativo na concepção de produtos químico para as várias funções que vão desde medicamentos a materiais, houve uma surpreendente falta de interesse em consideração de risco no processo de *design*.

Compreender as propriedades de uma molécula que têm impacto sobre o meio ambiente e as transformações que ocorrem na biosfera é essencial para a sustentabilidade. Através de um domínio dessa compreensão, a química será capaz de projetar moléculas que são mais seguras para os seres humanos e o meio ambiente.

Os solventes são talvez a área mais ativa de pesquisa em Química Verde. Eles representam um importante desafio para a mesma, porque muitas vezes são responsáveis pela grande maioria do desperdício em massa em sínteses e

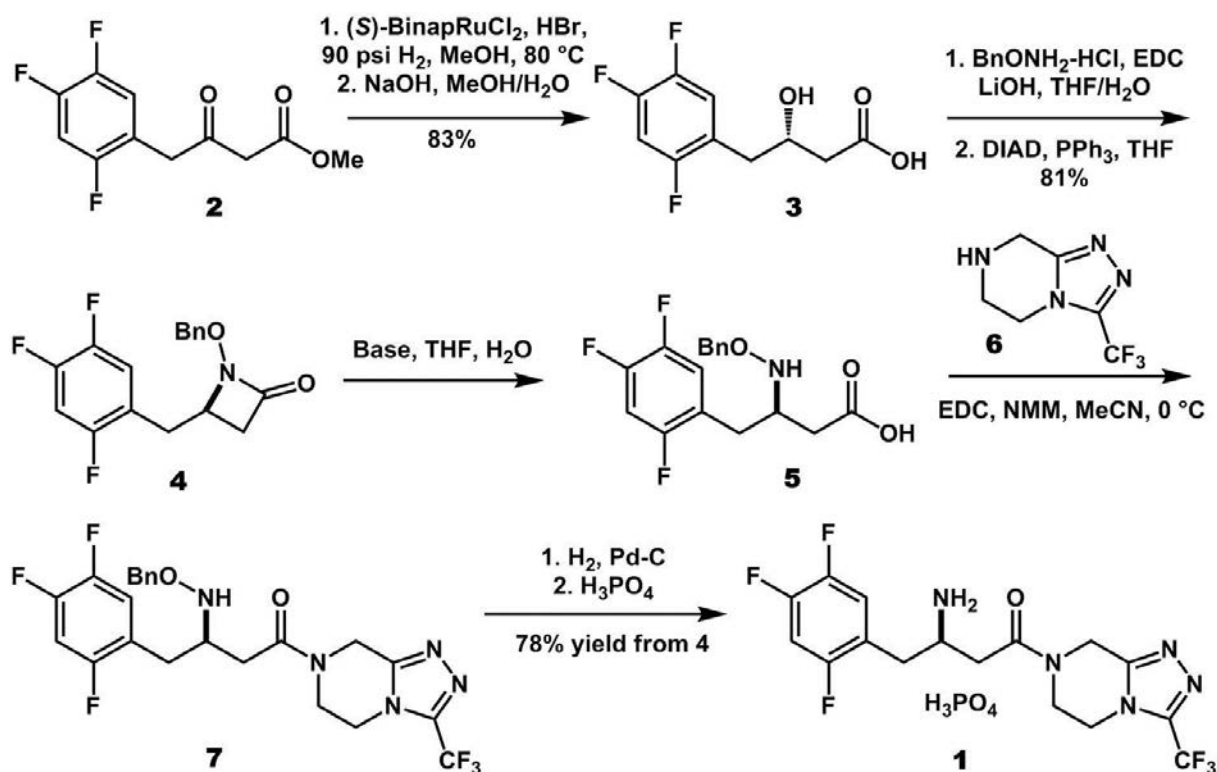
processos. Além disso, muitos solventes convencionais são tóxicos, inflamáveis e / ou corrosivos. Sua volatilidade e solubilidade têm contribuído para a poluição do ar, da água, e da terra, tendo aumentado o risco de exposição dos trabalhadores, e levando a acidentes graves. Sempre que possível, a situação ideal seria a de não utilizar qualquer solvente, pois a decisão de incluir um auxiliar sempre implica em esforços e energia para removê-lo a partir de um designado sistema. Esforços têm sido, portanto, dedicados ao desenvolvimento de sistemas livre de solventes. Quando um sistema sem solventes não é possível de acontecer, precisa-se ter em mente sempre a recuperação e reutilização, mas isso também é frequentemente associado com a consumação de muita energia e, por vezes, contaminação cruzada. Em um esforço para tratar de todas essas deficiências, os químicos começaram a busca de soluções mais seguras. Sistemas de solventes, água, fluidos no estado supercrítico e, mais recentemente, líquidos iônicos, são alguns exemplos dessas novas alternativas verdes.

Existem inúmeros exemplos de mudanças industriais bem-sucedidas que utilizam Química Verde, tais como: uma via de síntese mais verde que foi atribuído à Eastman por suas esterificações enzimáticas (este processo biocatalítico é executado sob condições suaves, minimiza a formação de subprodutos e poupa energia, resultando em um aumento da eficiência. No geral, centenas de litros de solventes orgânicos foram eliminados do processo anterior.); em 2008, pesquisadores da *Dow AgroSciences* foram premiados pelo projeto de pesticidas verdes; em 2006, a *Merck* desenvolveu um caminho alternativo para Sitagliptina, um derivado ácido  $\beta$ -amino quirál utilizado para o tratamento de diabetes tipo 2 (figura 1). A rota original está esquematizada na figura 2. Em 2004, a BMS desenvolveu uma nova abordagem para o Paclitaxel, o ingrediente ativo do Taxol, uma droga anticâncer. Em vez de sintetizá-lo a partir de um precursor, o composto ativo foi extraído diretamente de culturas de células de plantas. Esse método eliminou todos os solventes orgânicos, reagentes perigosos e medidas adicionais associados com o processo anterior. BMS agora apenas fabrica Paclitaxel utilizando culturas de células vegetais (ANASTAS, EGHBALI, 2010).



**Figura 1.** Nova rota sintética da Sitagliptina.

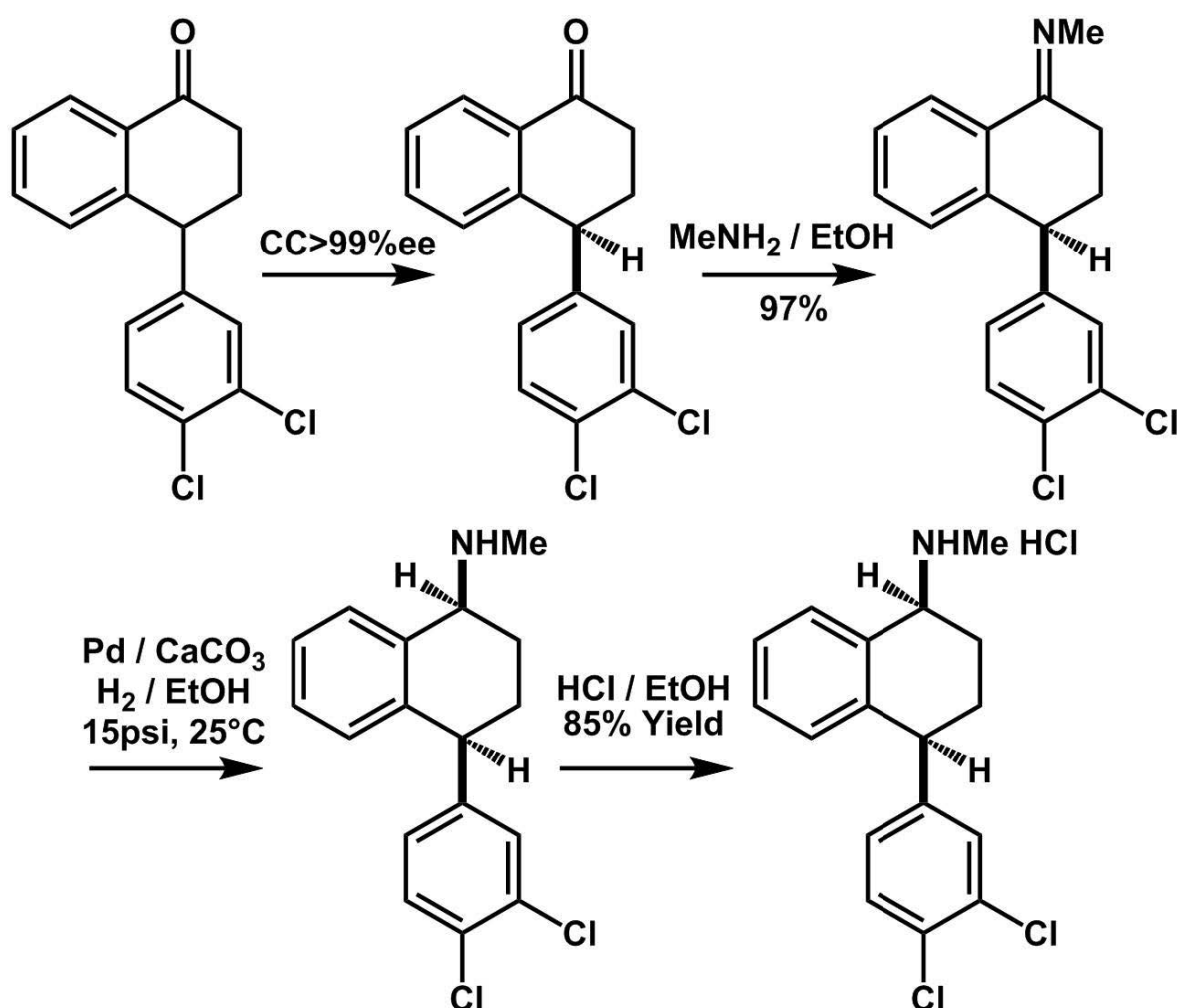
Fonte: ANASTAS, EGHBALI, 2010.



**Figura 2.** Rota Original da Sitagliptina.

Fonte: HANSEN et. al., 2009.

Em 2002, a Pfizer desenvolveu uma nova rota sintética mais verde para a síntese de sertralina, um ingrediente ativo usado no tratamento da depressão (Figura 3). O novo processo oferece vantagens ambientais substanciais enquanto melhora a eficiência global e a seletividade da síntese. Especificamente, uma sequência de três etapas no processo de fabricação inicial foi simplificado para uma única. A utilização de matérias-primas foi significativamente eliminada, e o processo foi otimizado para que todas as medidas possam ser realizados em etanol. Esta última alteração eliminou a necessidade de usar, destilar, e recuperar quatro solventes tóxicos: cloreto de metileno, tetrahydrofurano, tolueno, e hexano (ANASTAS, EGHBALI, 2010).



**Figura 3.** Nova síntese da Sertralina.

Fonte: ANASTAS, EGHBALI, 2010.

Uma das ramificações da grande área da química verde, é a “química analítica verde”, a qual concerne diferentes meios para a aplicação efetiva do termo em si. Química analítica verde tem sido definida como "o uso de técnicas de química analítica e metodologias que reduzem ou eliminam solventes, reagentes, conservantes e outros produtos químicos que são perigosos para a saúde humana ou para o ambiente e que pode também permitir uma análise mais rápida e mais eficiente sem comprometer os critérios de desempenho (ORDOÑEZ et al., 2015).

Uma das técnicas mais comuns para extração/determinação de compostos orgânicos é a cromatografia verde, a qual possui alguns objetivos, tais como: baixo custo, baixo consumo de aditivos e solventes tóxicos, impacto ambiental limitado, isenção de resíduos na fase de extração do solvente da amostra (extrato) e a habilidade de recuperar o solvente quase completamente (PLOTKA et al., 2013)

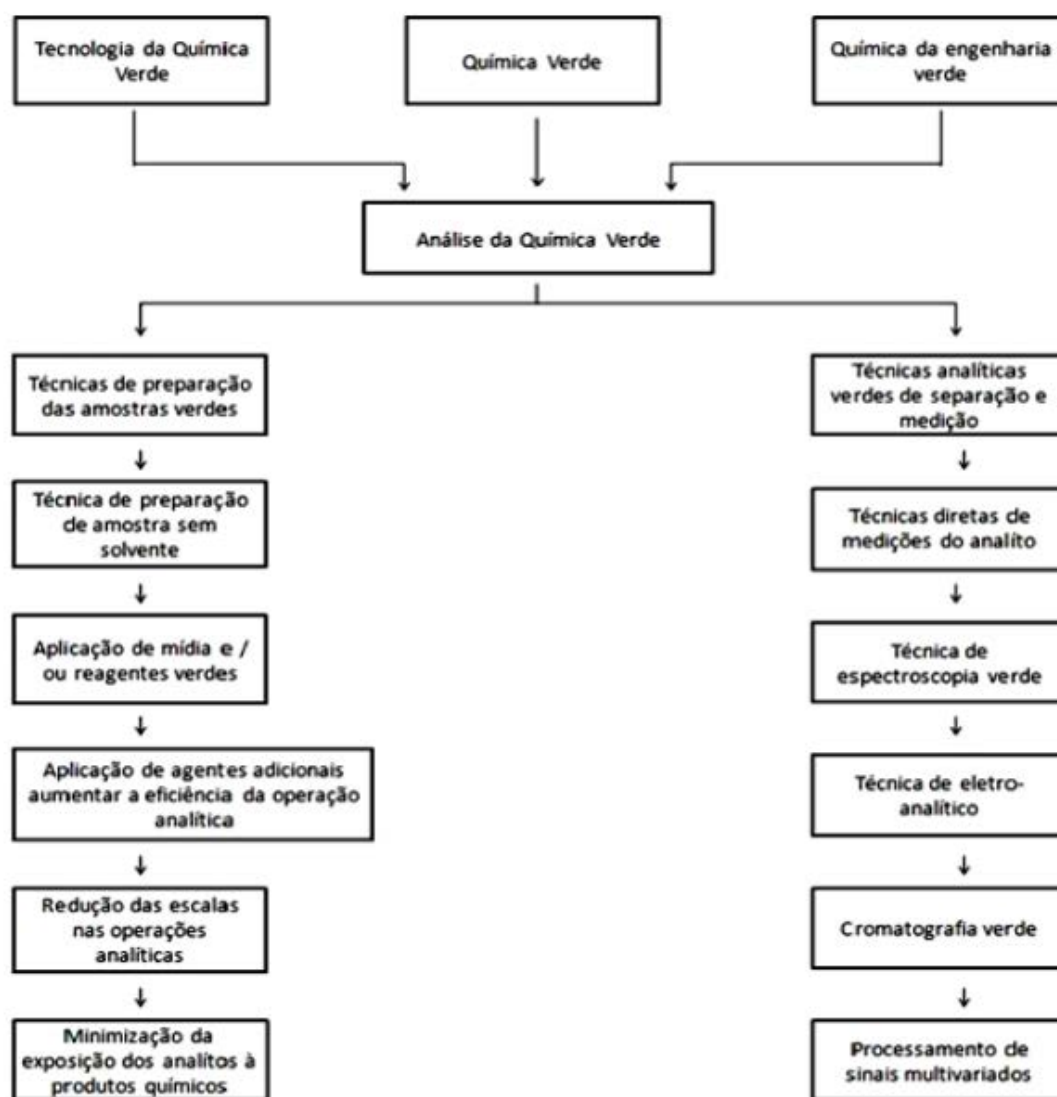
O interesse na química analítica verde está crescendo. Livros focados nesse tópico vem sendo publicados, como por exemplo, *“Green Analytical Chemistry”*, *“Challenges in Green Analytical Chemistry”* e *“Handbook of Green Analytical Chemistry”*. Não somente livros mas, através de periódicos e publicações na Internet, a literatura concernente a esse tema, cresce vertiginosamente.

A Figura 4 ilustra como a química analítica verde pode ser aplicada, desde a preparação da amostra, até a última etapa do processo. Enquanto os doze princípios da química verde podem ser aproveitados em quase todas as ramificações da química em geral, alguns deles são aplicados diretamente à química analítica verde, como por exemplo, o princípio 11; análise em tempo real para a prevenção da poluição.

A grande maioria das determinações de compostos orgânicos são realizadas utilizando métodos de cromatografia gasosa ou líquida. Dentro da química limpa, é vital que esses procedimentos tenham insignificante impacto ambiental. Técnicas cromatográficas têm o potencial de serem mais verdes em todos os passos da análise, desde a coleta de amostras e preparação para a separação até a determinação final.

As abordagens utilizadas para realizar separações cromatográficas mais verdes diferem dependendo do tipo de cromatografia. Na cromatografia gasosa, é aconselhável que não se use o gás hélio na fase móvel, já que ele é uma fonte não renovável. Nessa técnica, utilizar a tecnologia de baixa massa térmica pode ser uma alternativa mais verde devido à economia de energia oferecidas por esta tecnologia.

Na cromatografia líquida, o foco deve ser na redução do consumo de solvente e substituição de solventes tóxicos e perigosos para o ambiente com alternativas mais benignas. Técnicas de separação multidimensionais têm o potencial de tornar mais esverdeada essas análises, tanto a cromatografia gasosa, quanto a líquida.



**Figura 4.** Princípios de Química Analítica Verde aplicada na preparação de amostra e na determinação da etapa final.

Fonte: (PLOTKA et al., 2013).

## 2. CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de análise de misturas por interação de seus componentes, que devem ser voláteis e semi-voláteis, entre uma fase estacionária e uma fase móvel. O mecanismo de separação se dá pela seguinte maneira: a amostra é injetada (injetor de amostra) e arrastada pela fase móvel (gás de arraste) através da coluna que contém a fase estacionária (coluna CG aquecida), onde ocorre a separação da mistura. Deve-se conhecer a resolução e a eficiência da coluna para a amostra a ser analisada (SOUZA, 2014).

Define-se resolução de uma coluna como a sua capacidade de separar satisfatoriamente dois picos adjacentes; e eficiência de uma coluna é definida como sua capacidade de produzir picos estreitos e agudos. Na cromatografia gasosa existem diferentes detectores que devem ser selecionados de acordo com a mistura a ser separada. As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas na fase móvel e passam por esse detector que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material separado. Detector é um dispositivo que indica os componentes separados pela coluna que examinam continuamente o material, gerando um sinal na passagem de substâncias que foram separadas. Existem três tipos:

- Universais: geram um sinal para qualquer composto;
- Seletivos: geram um sinal apenas para compostos com determinadas características;
- Específicos: geram um sinal para compostos que tenham um determinado elemento em sua estrutura (SOUZA, 2014).

As características da fase móvel ou gás de arraste são que: precisa ser inerte, pois não pode interagir nem com a amostra, nem com a fase estacionária, apenas transporta a amostra através da coluna; precisa ser puro, pois não pode contaminar a amostra ou gerar ruído no sinal; compatível com o detector. Exemplos: gás hélio, gás nitrogênio, gás hidrogênio.

As características da fase estacionária, são que: precisa ter características similares das dos solutos a serem separados; precisa possuir uma determinada seletividade, deve ser um bom solvente diferencial dos componentes da amostra; quimicamente inerte relativamente à amostra; volatilidade baixa; estabilidade térmica; pouco viscoso e puro. As fases estacionárias mais utilizadas são: parafinas (apolares), poliglicóis (polares), poliésteres (polares), silicones (cobrem ampla faixa de polaridade) (SOUZA, 2014).

A amostra atinge a fase estacionária sendo parte absorvida e estabelece-se o equilíbrio entre esta parte e uma outra que permanece na fase gasosa, que por sua vez continua no gás de arraste até estabelecer o equilíbrio. O gás de arraste atinge a fase estacionária, o que leva a amostra a entrar novamente neste para restabelecer o equilíbrio (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) possui como principal mecanismo de separação a partição dos componentes de uma amostra entre a fase

móvel gasosa e a fase estacionária líquida. A utilização de fases estacionárias sólidas, as quais levariam à separação por adsorção, apresenta poucas aplicações.

Degani (2012) atesta que:

A cromatografia gasosa em geral é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas. A diferença entre CG e CGAR está na coluna (tubos longos de metais como aço ou cobre, vidro ou teflon). Colunas de CGAR são maiores em comprimento, menores em diâmetro, possuem a fase líquida como um filme aplicado diretamente às paredes do tubo da coluna e são mais eficientes.

A cromatografia gasosa possui características inerentes de química verde, porém é possível realizar algumas otimizações que a torna mais verde.

Nessa técnica, utilizar a tecnologia de baixa massa térmica pode ser mais verde por causa da economia de energia oferecidas por esta tecnologia. A escolha do gás de arraste também é um meio de tornar cromatografia gasosa mais verde. O hélio (He), é o gás de arraste mais utilizado na cromatografia gasosa, devido às suas propriedades cromatográficas favoráveis, (velocidade linear elevada) ao mesmo tempo que não tóxico, não inflamável, inerte e seguro de manusear. No entanto, hélio também é um recurso não renovável, e reservas mundiais desse gás precioso está prestes a esgotar-se.

Nitrogênio também pode ser utilizado como um gás de arraste na cromatografia gasosa. No entanto, a sua velocidade linear é baixa quando comparado com o hélio ou o hidrogênio, o que leva a tempos de análise longos, o que pode causar danos em sua eficiência. Esses dois fatores tornam o nitrogênio um gás de arraste menos desejável para a cromatografia gasosa.

O hidrogênio parece ser a melhor alternativa para gás de arraste em cromatografia gasosa. A velocidade linear do hidrogênio é a mais alta dos três gases em comparação aqui, e a curva de van Deemter é muito plana, portanto, as separações podem ser realizados com doses mais altas e com pouca perda de eficiência. Consequentemente, os tempos de análise são mais curtos com o hidrogênio como gás de arraste. Além disso, a grande extensão ao longo do qual a alta eficiência é obtida torna o hidrogênio o melhor gás para as amostras que

contêm compostos que eluem ao longo de um amplo intervalo de temperatura, quando a pressão constante é usada. Acima de todas essas vantagens, ele é um gás que está disponível para o uso, já que é renovável (PLOTKA et al., 2013).

A próxima abordagem para tornar a cromatografia gasosa mais verde é a redução do tempo de análise conduzindo ao aumento da produtividade de amostras. Isto pode ser conseguido por meio de colunas mais curtas do que o convencional e com menor diâmetro interno (ID) sem sacrificar a separação e resolução. Além disso, a velocidade do gás de arraste é aumentada com tais colunas, o que contribui para uma redução do tempo de análise. A desvantagem de usar colunas estreitas em diâmetro; é que elas ficam com a capacidade de amostra reduzida, o que frequentemente leva à sobrecarga da coluna. (PLOTKA et al., 2013).

As aplicações práticas da cromatografia verde gasosa abrangem diversas áreas, tais como: a área química (determinação de antioxidantes, nutrientes ou contaminantes de alimentos, etc), área industrial (monitorização de processos industriais), área da saúde (análises dos constituintes do sangue; análise forense), área ambiental (determinação de resíduos de pesticidas em produtos alimentares, água ou esgoto; determinação de solventes orgânicos na atmosfera, solos ou rios).

### **3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Maldaner (2012) afirma que:

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica muito utilizada e é empregada nas mais diversas áreas, entre elas, química forense, toxicológica, clínica e ambiental, para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica, como desenvolvimentos de novas fases estacionárias (FE) e suportes cromatográficos, avanços na instrumentação, entre outros, permitindo que análises mais rápidas e mais eficientes sejam alcançadas, corroborando com a necessidade atual de aumentar o número de análises e o rendimento e reduzir os custos.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica utilizada para separar e quantificar componentes em uma mistura. É distinguida por usar a fase móvel à alta pressão. O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica.

O uso de partículas menores (na ordem de 5,0  $\mu\text{m}$ ) no recheio da coluna resulta em uma área superficial (o sítio de adsorção) maior, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essa "miniaturização" das partículas da coluna permite o uso de colunas menores, volumes menores de amostras e um gasto menor de fase móvel. Assim sendo, em cromatografia líquida de alta eficiência é possível trabalhar na faixa dos microlitros ( $\mu\text{L}$ ).

Hoje em dia são oferecidos também equipamentos chamados CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Em inglês, UPLC), que trabalham com partículas de colunas ainda menores (até 0,01  $\mu\text{m}$ ) e pressões ultraelevadas (da ordem de 15.000 psi). A utilização de suportes com partículas diminutas são os responsáveis pela alta eficiência desse método de cromatografia.

O processo físico-químico envolvido na separação das substâncias em uma amostra é o mesmo para a CLAE e CLUE. A fase móvel (líquida) movimenta-se continuamente através da coluna contendo a fase estacionária (sólida). O soluto (substâncias contidas na amostra) interage com a fase estacionária e móvel por adsorção, partição, exclusão molecular, troca iônica. As separações podem se dar por adsorção (separação sólido líquido), partição (separação líquido líquido) ou ambos. O detector mais utilizado para análises por CLAE e CLUE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, eletroquímicos, entre outros (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A cromatografia líquida é geralmente considerada menos verde do que a cromatografia gasosa, uma vez que requer solventes para a separação. Por outro lado, a cromatografia líquida oferece mais possibilidades de "ecologização".

Uma das alternativas é a substituição de solventes tóxicos por solventes "verdes". Um solvente verde é aquele que não oferece riscos à saúde do analista, oferece segurança no manuseio e biodegradabilidade, ao mesmo tempo, respeitando o meio ambiente (evitando a depleção do ozônio e produzindo menos emissão para o ar) e envolvendo recursos renováveis. Para avaliar o quão verde um solvente é, deve-se também ter em conta os processos de produção, possibilidades de reciclagem bem como seus custos de energia (LESELLIER, WEST, 2015).

Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma possibilidade viável para reduzir a quantidade de resíduos gerados por solventes tóxicos, com base no seu mais elevado poder de resolução, em comparação com a cromatografia líquida convencional. Além disso, a substituição de solventes é um pilar fundamental

na cromatografia líquida verde, substituindo as fases móveis mais comuns, misturas como a acetonitrila/água ou metanol/água por solventes como água, acetona e etanol.

Mesmo esses solventes alternativos não sendo tão convenientes quanto os convencionais; combinados com temperaturas elevadas, podem proporcionar soluções eficientes para a cromatografia verde. Para tanto, é requerido um controle preciso das temperaturas da coluna e da fase móvel. O uso de água na fase móvel, como na maior parte dos de fase reversa de separações, resulta em perda de fase ligada a partir do suporte de sílica, devido à hidrólise, a qual vem sendo aprimorada para altas temperaturas; contudo, como tem sido demonstrado em vários estudos, pontes de etileno à base de sílica em colunas na fase reversa, podem ser utilizados a temperaturas superiores a 100 ° C, sem o medo de um rápido colapso. Na prática, as fases estacionárias com maior estabilidade da temperatura baseiam-se em outros materiais de sílica, por exemplo carbono grafitado, à base de óxido de zircônio e de poliestireno / fases de divinilbenzeno (ORDOÑEZ et al., 2015).

Um bom solvente para cromatografia em coluna também deve ter uma viscosidade limitada, favorecendo elevados coeficientes de difusão e de possíveis altas taxas de fluxo, como também apropriada polaridade, permitindo assim, a eluição.

As estratégias para tornar a CLAE mais verde são usar componentes verdes na fase móvel (exemplo: etanol e água), minimizar o consumo dos solventes orgânicos (para tanto, mudanças na coluna são necessárias), utilização de fluidos supercríticos, reduzir a taxa de fluxo da fase (possível quando o diâmetro interno é reduzido), aumentar a produtividade cromatográfica (reduzir o tamanho da partícula e reduzir o comprimento da coluna, agilizam a análise, ou seja, é feita mais rapidamente).

Novas técnicas para alcançar esses objetivos estão sendo cada vez mais empregadas, tais como: Cromatografia Líquida a Alta Temperatura (CLAT), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), micro – CL, e Cromatografia Supercrítica; as quais serão discutidas nos próximos tópicos.

### 3.1 SUBSTITUIÇÃO DE SOLVENTES

#### 3.1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A ALTA TEMPERATURA

Um parâmetro que pode ser usado como uma variável poderosa na cromatografia líquida é a temperatura. Sabe-se que a temperatura da coluna afeta a seletividade, eficiência e detectabilidade. O termo Cromatografia Líquida a Alta Temperatura (CLAT) ou *High Temperature Liquid Chromatography* (HTLC) se refere ao uso de temperaturas entre 40 a 200°C. Uma vez que é mais fácil de alterar a temperatura durante a fase de desenvolvimento de um método em relação a outros parâmetros, tais como a composição da fase móvel ou pH, a temperatura elevada, tornou-se um parâmetro popular usado para tornar mais verde a CLAE. As mudanças de temperatura podem ser muito úteis no que diz respeito ao ajuste de seletividade, especialmente para os compostos polares e ionizáveis.

Por ser uma técnica que trabalha em altas pressões, a viscosidade da fase móvel é um fator relevante na CLAE. A viscosidade decresce exponencialmente em função da temperatura, assim, o aumento da temperatura permite: a utilização de maiores vazões; o emprego de partículas com menores diâmetros; e a utilização de colunas com maior comprimento ou conectadas em série (BORGES, BOTTOLI, COLLINS, 2010).

A utilização da CLAE com temperaturas elevadas provoca uma mudança considerável nas propriedades físico-químicas da fase móvel. Além da viscosidade, como já mencionado anteriormente, temperaturas elevadas provocam também alterações na tensão superficial, constante dielétrica e pKa da fase móvel. Tudo isso leva a vantagens consideráveis, como a redução do tempo de análise, aumento da seletividade e resolução; o que resulta na possibilidade de utilização de solventes menos tóxicos porém mais viscosos que os tradicionais, com por exemplo o etanol.

Além disso, a temperatura influencia na pressão da coluna, fator de retenção, na eficiência cromatográfica, assimetria e resolução.

Cromatografia líquida a alta temperatura usando como fase móvel somente água superaquecida, em temperaturas entre 100 e 250°C oferece numerosas vantagens para o analista. É um solvente limpo, reduz os custos de utilização e substitui os solventes orgânicos. Possui também maior compatibilidade com os detectores mais utilizados, permitindo que os espectros na região do ultravioleta

sejam monitorados em comprimentos de onda menores, interface de menor custo para acoplamento com a espectrometria de massas. Com o emprego de água deuterada, como eluente, a CLAE pode ser acoplada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Um grande problema em se utilizar somente água pura como fase móvel na CLAE é a incompatibilidade com a maioria das colunas de fase reversa, alta viscosidade e baixa seletividade, quando comparada com os solventes mais comuns como acetonitrila e metanol.

O uso de água na fase móvel resulta em perda de fase ligada a partir do suporte de sílica, devido à hidrólise; contudo, como tem sido demonstrado em vários estudos, pontes de etileno à base de sílica em colunas na fase reversa, podem ser utilizados a temperaturas superiores a 100 ° C, sem problemas com a degradação (BORGES et al., 2010)

A constante dielétrica ( $\epsilon$ ) da água diminui de 80, em temperatura ambiente, para valores de até 20 a 300°C. Assim, o uso da água como fase móvel em altas temperaturas pode simular as propriedades de uma mistura da água com modificadores orgânicos. A seletividade em cromatografia empregando água superaquecida como fase móvel (*Super Heated Water Chromatography*, SHWC) é controlada apenas pelo aumento da temperatura.

O desenvolvimento recente de fases termicamente mais estáveis, incluindo fases híbridas, têm expandido a quantidade de tipos de analitos que podem ser examinados e estes agora variam de alquilbenzenos, fenóis, alquilaril, cetonas e um certo número de produtos farmacêuticos para os ácidos carboxílicos, aminoácidos e hidrocarbonetos. Muito poucos compostos são instáveis durante a análise. Os métodos de separação podem ser acoplados diretamente com a extração de água superaquecida, proporcionando um sistema totalmente livre de solvente para extração da amostra e análise (SMITH, 2008).

Avanços no desenvolvimento de fases estacionárias termicamente estáveis, vem tornando a cromatografia com água superaquecida um método mais acessível de cromatografia líquida, com potencial de fornecer um método eficiente de separação verde. Ela oferece uma série de possibilidades para a detecção, inclusive podendo ser acoplada com detectores de cromatografia gasosa, como o detector de ionização de chama. Mais aplicações estão sendo continuamente demonstradas, e,

juntamente com métodos de extração acoplados, estão ampliando a área de aplicações (SMITH, 2008).

O etanol é uma outra alternativa viável como solvente para CLAE verde, por ser um solvente mais barato e menos tóxico do que metanol e acetonitrila. Apesar de sua viscosidade ser maior do que esses solventes a 25°C, a mesma pode ser controlada por gradientes de temperatura que inclusive pode também alterar sua seletividade, tornando-a mais próxima da seletividade da acetonitrila e metanol. Em relação a compatibilidade com detectores, o etanol pode ser usado no UV a mais de 220 nm ou no detector de massas. Limitações quanto à pressão podem ser resolvidas com temperatura entre 40 – 60°C (BORGES et al., 2010).

## **3.2 REDUÇÃO DE RESÍDUOS**

### **3.2.1 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)**

Tratando-se de cromatografia em coluna, nos últimos anos observou-se uma tendência na redução das dimensões da coluna. A diminuição do comprimento da coluna é favorecida pela diminuição concomitante no diâmetro das partículas de fase estacionária a qual permite que uma elevada eficiência possa ser mantida. Consequentemente, diminuindo o diâmetro interno da coluna, haverá uma redução da taxa de fluxo proporcional, causando uma redução do consumo de solventes. Isso tudo resultou na criação de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que exigiu sistemas de bombeamento especiais que poderiam atingir 1000 Bar e suporte de sílica altamente resistente para enfrentar essas pressões elevadas.

A CLUE fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da CLAE, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária (FE) menores ou iguais à 2 µm, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, um equipamento adequado para CLUE tem que ser capaz de operar a altas pressões, acima de 1000 bar (~15000 psi) (RIDDLE, GUIOCHON, 2006).

A CLUE tem se tornado relevante para a Química Verde, pois suas vantagens correspondem aos objetivos da mesma, que são: menor geração de resíduos, diminuição no tempo de análise, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis, melhor resolução e detectabilidade, pequeno volume de amostra, economia de fase estacionária e fase móvel. No entanto, uma avaliação completa de como a CLUE é relevante para a química verde, não deve limitar-se a reduzir o consumo de solvente, mas também deve ter em conta os custos de energia associados com a fabricação, manutenção e uso do instrumento e colunas (LESELLIER, WEST, 2015).

Mesmo usando partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , a eficiência da sua coluna continua alta, apenas há a diminuição em seu comprimento. Uma coluna menor, além de gastar menos solvente, permite separações mais rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna, porém isso requer a otimização de outros parâmetros experimentais. Por exemplo, a diminuição do tamanho da partícula provoca um aumento na pressão do sistema. Outros fatores que precisam ser otimizados são o volume extra da coluna, tempo de residência dos gradientes, tempo que a fase móvel leva para percorrer o sistema cromatográfico desde a saída do misturador até o topo da coluna, como forma de minimizar o alargamento do pico cromatográfico e obter máxima eficiência da coluna.

A primeira empresa a desenvolver um equipamento capaz de operar a pressões que correspondem a CLUE foi a Waters Corporation, em 2004, que desenvolveu um equipamento capaz de trabalhar com pressões acima de 100 MPa e deu o nome ao equipamento de UPLC (*Ultra Pressure Liquid Chromatography*). Depois disso, outros fabricantes também lançaram seus equipamentos de CLUE no mercado. E Hoje, 11 anos após o surgimento da técnica, mais de 30 fabricantes estão comercializando colunas de CLUE recheadas com FE de tamanhos de partículas que variam de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ , preparadas a partir de suportes de sílica ou de sílica híbrida e modificadas com diferentes grupos químicos como:  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$ , fenil, ciano e grupos polares embutidos (MALDANER, JARDIM, 2012).

As modificações básicas necessárias em um equipamento de CLUE são:

- Capacidade de trabalhar em pressões muito altas (100 mPa);
- Volumes internos muito menores (conexões, alças de amostragem, cela do detector, bombas);

- Celas do detector sem dispersão, e com alta taxa de aquisição;
- Melhoramento no sistema de controle e de dados;
- Colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto;
- Injetores com precisão na faixa de volumes pequenos.

Tratando-se do sistema de gerenciamento da fase móvel, são requeridas bombas robustas capazes de impulsionar a fase móvel de forma suave e reproduzível nestas altas pressões, para compensar a compressibilidade do solvente, e que sejam capazes de operar tanto no modo eluição isocrático como por gradiente. Devido à compressibilidade do solvente a altas pressões, o fluxo deve ser impulsionado de forma rápida, e o sistema deve ter baixos volumes para se obter um bom desempenho.

A injeção da amostra é realizada de forma automática, rápida, exata e precisa. O amostrador possui controle de temperatura entre 4 – 40 °C. Os equipamentos de CLUE possuem uma faixa de injeção de apenas 0,1-50 µm (MALDANER, JARDIM, 2012).

Em relação às fases estacionárias utilizadas em cromatografia líquida de forma geral, muitos avanços já aconteceram, porém as FE próprias para serem empregadas em CLUE ainda são alvos de desenvolvimento, devido ao nível de excelência exigido por esses sistemas.

Quanto aos sistemas de detecção, os detectores possuem alta taxa de aquisição de dados. Necessitam de diminuição do volume da cela do detector e um longo caminho óptico, para manter a concentração e o sinal e uma baixa dispersão da amostra, a fim de se obter uma alta detectabilidade. As dimensões do volume da cela e o comprimento do caminho óptico desses detectores são de aproximadamente 500 nL e 10 mm, respectivamente.

Atualmente, praticamente todos os novos desenvolvimentos e/ou artifícios em torno de novas FE ou de novas estratégias de trabalho podem também ser transferidas/aplicadas às separações realizadas pela cromatografia líquida de ultra eficiência.

Um exemplo deste fato são as partículas de sílica superficialmente porosas (SPP) (SPP – *superficially porous particles*), que são compostas por um núcleo sólido revestido por uma fina camada de sílica porosa, que foram desenvolvidas

como uma alternativa às partículas de FE porosas  $\leq 2 \mu\text{m}$ , por fornecerem análises rápidas e com eficiências similares, porém sem um aumento significativo da pressão cromatográfica, sendo, desta forma, compatíveis com os sistemas convencionais de CLAE.

Mesmo com todas essas vantagens, a utilização da CLUE ainda é limitada. Essa limitação pode estar relacionada com a necessidade de instrumentos específicos para o emprego eficiente de partículas menores ou iguais à  $2 \mu\text{m}$  e ao custo dos equipamentos e consumíveis que são superiores aos de CLAE (MALDANER, JARDIM, 2012).

Dentre as aplicações da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência está a determinação de diferentes fármacos, agrotóxicos, conservantes em cosméticos à base de cromo, toxinas marinhas, cianobactérias, drogas veterinárias e enzimas.

### 3.2.2 – MICRO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Os recentes desenvolvimentos em cromatografia líquida (CL) são dedicados principalmente para sistemas de miniaturização como micro-CL e nano-CL, visando diminuição do tempo de análise e redução de amostra e solvente.

De acordo com a literatura, cromatografia líquida miniaturizada pode ser definida com colunas de 0.5- 1 mm de diâmetro. Micro-CL apresenta muitas vantagens quando comparada com a cromatografia líquida convencional. Os benefícios mais importantes da miniaturização surgem a partir da capacidade de trabalhar com tamanhos de amostra limitados e taxas de fluxos baixas. Outra vantagem de redução do diâmetro da coluna é o ganho em sensibilidade (para a mesma quantidade injetada) obtida com os dispositivos de detecção, tais como os detectores de UV-Vis, fluorescência, e Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray*. Apesar das vantagens mencionadas, CL miniaturizada ainda é pouco utilizada, tendo maiores aplicações na área de proteômica, pois exige uma instrumentação mais complexa (GUILLARMEA, et al., 2008).

Investigações detalhadas do metabolismo lipídico, por exemplo, exigem métodos eficientes para a separação, identificação e quantificação dos mesmos. De fato, lipídios são compostos por diferentes classes, e essas, por sua vez, são compostas por espécies moleculares distintas. A grande diferença estrutural entre as

classes de lipídios induz uma importante gama de polaridade. Por isso se faz necessário utilizar métodos sensíveis de análise, os quais permitem detectar e quantificar todos os lipídios apresentados em amostras biológicas de baixas concentrações. A técnica da micro-CL supre esse requisito pois as colunas com menores diâmetros aumentam a sensibilidade, quando comparado com colunas de cromatografia líquida convencionais. (HAZOTTE et al., 2007).

O detector evaporativo de espalhamento de luz (DEEL) é o detector primário utilizado para analisar lipídios devido à sua compatibilidade com uma grande gama de solventes e de eluição em gradiente. Este detector quase universal pode detectar todos os solutos que são menos voláteis do que a fase móvel. Além disso, no caso específico de análise de lipídios, o interesse combinar a micro-CL e o DEEL com a cromatografia líquida a alta temperatura, tem aumentado recentemente, como visto em diversos artigos sobre o assunto. Juntos, permitem diminuir o tempo de análise para melhorar a eficiência na alta taxa de fluxo e utilizam uma menor quantidade de solventes orgânicos, o que leva a análise de lipídios na direção da Química Verde (HAZOTTE et al., 2007).

Outro aspecto vantajoso para a micro-CL é maior facilidade de acoplamento com a espectrometria de massas, quando comparado com a CLAE tradicional, o que torna a técnica interessante do ponto de vista de seletividade.

O aumento do número e da complexidade das amostras que precisam ser analisadas em aplicações industriais impulsiona os cromatografistas a procurar aumentar a resolução nas separações e reduzir o tempo de análise. Eficiência, e consequentemente resolução, pode ser aumentada pela redução do tamanho de partícula de uma coluna, mas envolve o aumento da pressão e requer o uso de equipamentos como os da CLUE (DIÓSZEGI, RAYNIE, 2012).

A redução da dimensão das amostras é de interesse geral em bioanálise. Por exemplo, a natureza heterogênea de células e tecidos pode resultar na necessidade de uma análise das subpopulações limitadas. Análises proteômicas para essas pequenas quantidades de misturas de proteínas apresentam desafios para separação e sensibilidade de detecção, especialmente considerando a gama de abundâncias de proteína (SHEN, et al., 2002).

Colunas com diâmetros de 4,6 milímetros, 2,1 mm e colunas menores que 1,0 mm pode ser operado usando a mesma bomba, colunas com diâmetro menores requerem uma bomba diferente ou o uso da divisão de fluxo. Fabricantes de

instrumentos optam por ambas as possibilidades. Enquanto um número de fornecedores trabalham com faixas de  $\mu\text{L}/\text{min}$  a  $\text{nL}/\text{min}$  fazendo uso de divisores, outros fornecem bombas com essa faixa de fluxo sem a necessidade de utilizar o divisor de fluxos, porém com custos mais elevados. É importante ressaltar que CL com divisor de fluxo não pode ser considerado cromatografia verde pelo fato de desviar a maioria da fase móvel para descarte, gerando assim maior quantidade de resíduo.

### 3.3 CROMATOGRAFIA SUPERCRÍTICA

A cromatografia supercrítica (CS) é um método de separação versátil: por um lado, o número de parâmetros que atuam sobre a qualidade da separação é muito grande, apesar dos efeitos destes parâmetros serem, por vezes, complexos (e nem sempre totalmente entendidos). Mas por outro lado, devido a inúmeras propriedades vantajosas de fases móveis à base de  $\text{CO}_2$ , o desenvolvimento do método pode ser uma tarefa fácil.

Após numerosos ensaios com uma variedade de fluidos, o dióxido de carbono foi definitivamente escolhido como a melhor fase móvel para a separação supercrítica por quase todos os analistas que utilizam a cromatografia. Esta escolha pode ser explicada pelos vários pontos positivos, tais como: o baixo custo, a não-inflamabilidade, a abundância (como sendo um subproduto de muitas indústrias) e disponibilidade com uma pureza adequada, a inércia para a maior parte dos compostos, os valores moderados de pressão (7,3 MPa) e temperatura (31°C) crítica, a miscibilidade de uma grande variedade de solventes orgânicos, a fraca absorbância no UV a baixo comprimento de onda, baixa viscosidade e tensão superficial. Além disso, há vantagens extras para separações em escala preparativa: a recuperação das frações concentradas após a separação (o que exige menos esforço para evaporar o solvente e recuperar frações puras) e a não-toxicidade do valor residual em produtos que entram em contato humano (LESELLIER, WEST, 2015).

Inicialmente, foi aplicada a cromatografia supercrítica em compostos não-polares (hidrocarbonetos e materiais lipofílicos), devido à baixa força de eluição do

CO<sub>2</sub> puro, que é considerado como sendo semelhante ao do pentano. No entanto, a adição de solventes orgânicos, chamados modificadores, aumenta fortemente a solubilidade do composto tanto para os compostos não-polares, tais como triglicerídeos ou carotenóides, quanto para os compostos polares, tais como carboidratos de pequenas cadeias. No entanto, a limitação da CS permanece, aparentemente, na análise de compostos muito polares e iônicos (tais como peptídeos e proteínas hidrofílicas), para os quais a solubilidade em fases móveis baseados em CO<sub>2</sub> é bastante baixa.

Hoje em dia, a maioria das análises é realizada com uma mistura de CO<sub>2</sub> e um co-solvente, normalmente denominado "modificador". A adição de um modificador é muitas vezes necessária para melhorar a solubilidade do analito, e evitar a precipitação da amostra quando é introduzido na entrada da coluna.

Quando a simples adição de um co-solvente para o dióxido de carbono não é suficiente para permitir a eluição dos analitos com boas formas dos picos, é comum introduzir um terceiro componente na fase móvel, sob a forma de um ácido, uma base ou um sal. Este terceiro componente é geralmente chamado "aditivo" e é introduzido em concentrações muito mais baixas do que o co-solvente (geralmente de 0,05-1%). Mesmo em percentagem mais baixa, melhorias significativas na forma do pico e as alterações na retenção têm sido relatados (LESELLIER, WEST, 2015).

Uma nota de cautela deve ser dada para o uso de aditivos. Após a sua introdução na fase móvel, que vai absorver primeiro na superfície da fase estacionária, em seguida, quando a fase estacionária é saturada, o aditivo eluirá a partir da coluna e, resultará em uma quebra através da curva que pode ser visível, dependendo do modo de detecção.

Cobertura da superfície da fase estacionária com o aditivo é independente da concentração de aditivo na fase móvel, mas inversamente proporcional à concentração do modificador, assim baixas proporções de modificador deve resultar em tempos de equilíbrio mais longos. Além disso, quando o aditivo é finalmente eluído, o ruído de linha de base é geralmente aumentado (LESELLIER, WEST, 2015).

Pequenas alterações na temperatura e pressão próximo ao ponto crítico de fluidos supercríticos (FS) resultam em alterações significativas nas suas propriedades físicas, tais como densidade, que podem ser usados para sintonizar a solubilidade e outros parâmetros do solvente. Usar solventes sob condições

supercríticas expande sua faixa de solubilidade e volatilidade. Consequentemente, fluidos supercríticos (principalmente dióxido de carbono) pode ser uma excelente escolha para ser usado como fase móvel em cromatografia gasosa.

Os fluidos supercríticos são considerados fases móveis verdes, devido ao seu limitado impacto ambiental, baixos custos de eliminação, a redução do consumo de solventes e aditivos tóxicos, falta de toxicidade (na maioria dos casos), a remoção do resíduo livre de solvente a partir do extrato e a possibilidade de recuperar o solvente quase completamente. A redução na utilização de solventes orgânicos resulta em benefícios de custo, de saúde e segurança, bem como a recuperação da amostra mais rápida e limpa durante os procedimentos experimentais. Os fluidos supercríticos oferecem alto poder de solubilidade, alta capacidade de transferência de massa e alta seletividade, portanto, eles encontram aplicações em técnicas de separação cada vez mais frequência.

O uso de outros fluidos supercríticos, distintos do dióxido de carbono, também têm sido relatados na literatura; no entanto, esses fluidos não possuem quaisquer vantagens distintas. Eles geralmente têm alta temperatura crítica e podem ser inflamáveis (especialmente solventes orgânicos). Fluidos supercríticos inorgânicos, tais como amônia ou óxido nitroso também têm inconvenientes significativos, tais como a neuro toxicidade ou forte carácter de oxidação, no caso do óxido nitroso.

O uso de CS para separações de compostos quirais tem sido um dos mais bem-sucedidos campos de aplicações, devido à alta difusividade e baixa viscosidade do fluido supercrítico como fase móvel. A CS está substituindo a CLAE em muitas aplicações farmacêuticas, não apenas para purificação, mas também como ferramenta de triagem e desenvolvimento de métodos padrão para compostos quirais.

As principais vantagens da cromatografia supercrítica em comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência, incluem maior eficiência, desenvolvimento de método mais rápidos, obtenção do equilíbrio da coluna mais rapidamente, flexibilidade na seleção de solvente e redução na geração de resíduos tóxicos e perigosos.

A sobrevivência da cromatografia supercrítica nas décadas de 1980 e 1990 é, essencialmente, graças aos seus benefícios reconhecidos para as enantio-separações, onde frequentemente forneceram melhores resoluções a uma velocidade maior do que CLAE. Na verdade, as separações quirais é um campo

onde os benefícios da cromatografia supercrítica sempre foram reconhecidos, onde, a primeira separação supercrítica dos enantiômeros foi feita por Mourier em 1985, portanto, há 30 anos (LESELLIER, WEST, 2015).

Embora ambas as técnicas (CS e CLAE) possam proporcionar uma boa seletividade de enantiômeros, a cromatografia supercrítica apresenta vantagens evidentes em termos de vazão da fase móvel, resolução, além do tempo de análise e consumo de solventes orgânicos. Em experiências realizadas e registradas na literatura, comparando essas duas técnicas, foi feito um estudo comparativo de separação de enantiômeros de vários remédios para o estômago, como por exemplo, omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol. Em suma, enquanto que a cromatografia supercrítica conseguiu realizar a separação quiral de todas as drogas envolvidas, a CLAE conseguiu apenas de duas: omeprazol e pantoprazol. Na CS, a resolução entre os pares críticos foi na maioria dos casos superiores a 2, e o tempo de análise era inferior a 10 minutos. A CLAE proporcionou menor seletividade e resolução, e os tempos de retenção eram mais longos. Outra desvantagem da CLAE foi o maior consumo de solventes orgânicos. A resolução completa dos enantiômeros foi realizada com ambas as técnicas; no entanto, a taxa de fluxo da fase móvel na cromatografia supercrítica foi em quatro vezes a taxa utilizada para a cromatografia líquida, o que permitiu que os analitos fossem separados em menos do que um terço do tempo necessário para a separação da CL (CS: 6 min; CL: 22 min) (PLOTKA et al., 2013).

Quando se trabalha com uma fase estacionária não polar como um enchimento de sílica ligada- $C_{18}$ , compostos aromáticos e hidrofóbicos são mais retidos enquanto que os compostos polares são menos retidos, assim padrões de retenção são comparáveis a CLAE de fase reversa, quando uma grande proporção de solvente orgânico está presente na fase móvel (minimizando assim os efeitos da água).

A mais famosa fase estacionária para a cromatografia supercrítica, para além da sílica mais simples, é 2-etilpiridina ligada à sílica. Ela surgiu há mais de 10 anos, e foi proposta pela Cromatografia de Princeton. Rapidamente se tornou conhecida como uma coluna que proporciona boas formas dos picos para compostos básicos, sem a necessidade de aditivos na fase móvel. Isso é possível devido a ligação do hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da piridina e dos grupos silanol residuais. Por isso, o último não estariam disponíveis para interações "parasitas" com analitos

básicos. Como resultado, a maioria dos fabricantes de colunas que estão dispostos a investir no campo da CS, agora propõe cada um a sua própria versão de sílica 2-etilpiridina ligada à sílica (LESELLIER, WEST, 2015).

O uso de detectores de células abertas em CS pode ser favorecido, no que diz respeito à cromatografia líquida, por despressurização do fluido que naturalmente fornece um pulverizador na entrada do detector. O detector de dispersão de luz evaporativo (ELSD) é geralmente usado para os compostos não voláteis que não possuam grupos cromóforos.

Este detector é baseado na formação de um pulverizador de fase móvel através de um bocal, a geração de gotículas numa câmara de nebulização. Quando estas gotas são aquecidos num tubo de deriva, como moléculas voláteis (componentes da fase móvel) são evaporados e as moléculas não voláteis remanescentes são capazes de espalhar a luz emitida por um fotodiodo, proporcionando assim uma resposta. Este detector tem sido principalmente usado com CS para análises de carboidratos (LESELLIER, WEST, 2015).

Nos últimos anos, tem aumentado a popularidade da cromatografia supercrítica não apenas pelo seu caráter mais verde, mas também por causa de uma maior disponibilidade de instrumentação comercial, incluindo acessórios que podem converter um sistema de CLAE convencional para um que seja capaz de realizar CS.

Muitas empresas farmacêuticas têm utilizado e desenvolvido métodos de cromatografia supercrítica nas escalas de análise e de preparação, essencialmente para separações quirais. Em várias empresas farmacêuticas, a ordem de escolha para o desenvolvimento do método, quando estão envolvidas a separação enantiomérica é primeiro: cromatografia supercrítica; segundo: cromatografia líquida de alta eficiência, e terceiro: eletroforese capilar. Enquanto que a CS com coluna cheia vem sendo a principal escolha para separações quirais, o recente aumento de aplicações aquirais é perceptível. Claramente, os benefícios que há muito tempo são reconhecidos para a separação dos enantiômeros são agora reconhecidos por outras espécies, bem como: separações rápidas com alta eficiência, de equilíbrio rápido permitindo processos de triagem e otimização rápidos, baixo consumo de solvente, minimizando custos e preocupações ambientais. Há também as vantagens na escala preparativa (frações concentradas obtidos com alta produtividade) que são, vantajosamente, transferidas para o campo aquiral, particularmente em

laboratórios de desenvolvimento de medicamentos, onde intermediários de síntese e dos produtos finais requerem purificação. Além disso, a versatilidade fornecida pela CS aquiral, com uma vasta oferta de fases estacionárias e possibilidades de exploração de parâmetros, juntos, fornecem uma ampla gama de seletividade, o que aumenta o interesse nesse âmbito.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As realizações no campo da Química Verde, até agora, são impressionantes devido aos esforços de cientistas e profissionais da indústria ao redor do mundo. No entanto, as conquistas alcançadas até agora são um prelúdio para os grandes desafios ainda a serem abordados pelo campo. A química verde está garantindo que toda a habilidade criativa (a qual possui tradição no campo da química), seja praticada de uma forma que construa positivamente no impacto sobre as pessoas e para o planeta como um todo. Ao fazê-lo, a Química Analítica Verde tem mostrado através de empresas inovativas que podem ser, ao mesmo tempo, economicamente mais rentáveis e menos nociva ao ambiente.

Apesar de uma quantidade impressionante de trabalhos terem sido feitos por profissionais da Química Verde em todo o mundo, as conquistas do passado empalidecem em comparação com o poder e potencial do campo (ANASTAS, EGHBALI, 2010).

As ferramentas básicas utilizadas para a execução da política pró-ecológica a nível internacional são, entre outros, instrumentos econômicos (subvenções e tarifas), controle ambiental e sistemas de monitoramento, pesquisa científica, educação ambiental, bem como instrumentos jurídicos e administrativos que regulam a proteção, gestão e utilização adequada dos recursos naturais e os benefícios por popularizar os princípios do desenvolvimento sustentável. A ideia de desenvolvimento ecológico sustentável foi apresentada pela primeira vez em 1987 no relatório da Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. No relatório, afirmava-se que o desenvolvimento da civilização humana e a satisfação das necessidades socioeconômicas da geração atual só seria possível se os recursos naturais fossem bem manejados e a relação entre o crescimento econômico e o cuidado com o meio ambiente e a saúde das gerações presentes e futuras fossem conscientemente mantidos, enquanto que os efeitos a longo prazo

das atividades industriais também deveriam ser considerados (SPIETELUN et al., 2013).

A implementação do desenvolvimento sustentável na vida profissional de químicos em ambas escalas laboratoriais e industriais, se manifestam pela aplicação das regras da química verde. Enquanto Anastas e colegas de trabalho estavam elaborando as ideias de química verde, o primeiro paradigma da química analítica verde também foi apresentado. Os princípios da química analítica verde são implementados em cada etapa do procedimento analítico.

Um esforço contínuo para detectar, identificar e quantificar os compostos presentes em níveis muito baixos em amostras ambientais com um nível adequado de sensibilidade e seletividade deve ser considerada como a principal força que impulsiona o trabalho dos químicos analíticos na direção de procedimentos elaborando o que inclui etapas preliminares de isolamento / enriquecimento dos analitos alvo.

Outro aspecto relevante é a miniaturização da instrumentação analítica. Ela traz muitas vantagens, dentre as quais a economia de espaço é provavelmente a menos importantes. Sistemas de separação miniaturizados normalmente exigem menos consumo, menor produção de resíduos, e seu consumo de energia é muito reduzido em comparação com sistemas de laboratório em tamanho convencional. A velocidade de separação e sensibilidade do método também podem geralmente serem melhoradas com sistemas miniaturizados. As características desses sistemas os tornam inerentemente verdes, e com capacidade satisfatória de serem cada vez mais utilizados, encurtando o tempo de análise e trazendo melhorias em seu poder de resolução.

A pesquisa na área da química verde tem crescido acentuadamente desde a década de 90 e nos últimos anos têm ganhado espaço na mídia devido à catástrofes ambientais relacionadas com mudanças climáticas.

Portanto, a busca por novas e desafiadoras soluções, por pesquisadores, que permitam evitar ou minimizar a geração de resíduos tóxicos por processos químicos industriais e laboratoriais é essencial não só para servir como exemplo para parcelas da população comum (que não pertencem a comunidade científica), mas também para completar um conjunto de ações que visam garantir um futuro próspero para o planeta Terra.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETRE, Associação Brasileira de Empresas de Tratamento de Resíduos. **Estudo sobre o Potencial de Geração de Energia a partir de Resíduos de Saneamento (lixo, esgoto), visando incrementar o uso de biogás como fonte alternativa de energia renovável – Resumo executivo de novembro de 2010**. PNUD e Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <[www.abetre.org.br](http://www.abetre.org.br)>. Acessado em 18 jul. 2014.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**. v. 39, p. 301-312, 2010.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, Current status, and Future Challenges of Green Chemistry. **Accounts of Chemical Research**. v. 35, p. 686-694, 2002.

BORGES, M. E.; BOTTOLI, B. G. C.; COLLINS, H. C. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**. v.33, p.945-953, 2010.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na escola**. n.7, p.21-25, 1998.

DIÓSZEGI, A. T.; RAYNIE E. D. Kinetic performance comparison of a capillary monolithic and a fused-core column in micro-scale liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1261, p.107– 112, 2012.

GUILLARMEA, D.; RUDAZA, S.; SCHELLINGA, C.; DREUXB M; VEUTHEYA J. L. Micro liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector at ambient and high temperature: Optimization of the nebulization cell geometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1192, p.103-112, 2008.

HANSEN, K. B.; HSIAO, Y.; XU, F.; RIVERA, N.; CLAUSEN, A.; KUBRYK, M.; ROSNER, T.; SIMMONS, B.; BALSELLS, J.; IKEMOTO, N.; SUN, Y.; SPINDLER, F.; MALAN, C.; GRABOWSKI, J. J. E.; ARMSTRONG, D. J. Highly Efficient Asymmetric Synthesis of Sitagliptin. **American Chemical Society**. v.131, p. 8798–8804, 2009.

HAZOTTE, A.; LIBONG, D.; MATOGA, M.; CHAMINADE, P. Comparison of universal detectors for high-temperature micro liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1170, p. 52-61, 2007.

HAZOTTE, A.; LIBONG, D.; CHAMINADE, P. High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**. v.1140, p.131–139, 2007.

LENARDÃO, J.E.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA C.C. “Green Chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**. v. 26, p. 123-129, 2003.

LESELLIER, E.; WEST, C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. **Journal of Chromatography A**. v.1382, p. 2-46, 2015.

MALDANER, L.; JARDIM I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**. v.32, p.214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**. v.4, p.197-207, 2012.

ORDOÑEZ, E. Y.; RODIL, R.; QUINTANA, J.B; CELA, R. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v.169, p.162-168, 2015.

PLOTKA, J.; TOBISZEWSKI, M.; SULEJ, A.M.; KUPSKA, M.; GÓRECKI, T.; NAMIESNIK, J. Green chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1307, p.1-20, 2013.

RIDDLE A. L.; GUIOCHON, G. Separation of free sterols by high temperature liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1137, p.173–179, 2006.

SANDRA, K.; MOSHIR, M.; D' HONDT, F.; VERLEYSSEN, K.; KAS, K.; SANDRA, P. Highly efficient peptide separations in proteomics. Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. v. 866, p. 48-63, 2008.

SHEN, Y.; ZHAO, R.; BERGER, J. S.; ANDERSON, A. G.; RODRIGUEZ, N.; SMITH, D. R. High-Efficiency Nanoscale Liquid Chromatography Coupled On-Line with Mass Spectrometry Using Nanoelectrospray Ionization for Proteomics. **Analytical Chemistry**. v. 74, p. 4235-4249, 2002.

SMITH, R. M. Superheated water chromatography – A green technology for the future. **Journal of Chromatography A**. v. 1184, p. 441-455, 2008.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, L.; GUARDIA, M.; NAMIESNIK, J. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**. v. 1321, p. 1-13, 2013.

SOUZA, D.A.X. Cromatografia Gasosa. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAEnoYAC/cromatografia-gasosa> Acesso em 25 Set 2014.

YANG, Y.; STRICKLAND, Z.; KAPALAVAVI, B.; MARPLE, R.; GAMSKY, C. Industrial application of green chromatography—I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. **Talanta**. v. 84, p. 169-174, 2011.

