



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



BRUNA DE SOUZA SILVA

Cromatografia verde

Araraquara

2021

BRUNA DE SOUZA SILVA

Cromatografia verde

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586c Silva, Bruna de Souza
Cromatografia verde / Bruna de Souza Silva. –
Araraquara : [s.n.], 2021
46 f. : il.

Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalheiro

1. Química verde. 2. Química analítica. 3. Cromatografia
líquida. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Etanol.
I. Título.

BRUNA DE SOUZA SILVA

Cromatografia verde

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Araraquara, 02 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Instituto de Química - UNESP, Araraquara



Profa. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre
Instituto de Química - UNESP, Araraquara



Profa. Dra. Isabel Duarte Coutinho
Instituto de Química - UNESP, Araraquara

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pelo acompanhamento, ensinamento, apoio e incentivo.

Aos meus pais Neila e Renato e irmãos Lucas e Renato, por todo apoio em todos os momentos, principalmente na etapa final do trabalho.

Aos meus amigos que sempre estiveram por perto, mesmo as vezes não podendo ser fisicamente. Em todos os momentos que precisei, sempre tive muito apoio.

A todas as amigas da república Muralha que sempre foram minha segunda família e que sempre estiveram ao meu lado durante essa caminhada.

As minhas amigas Laura, Isabela e Ingrid, por ajudarem de todas as formas, direta e indiretamente, na vida acadêmica e na pessoal. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade.

RESUMO

O trabalho desenvolvido trata-se de uma revisão literária sobre a aplicação da química verde na cromatografia líquida, mais especificamente em cromatografia líquida de alta eficiência. A preocupação com o perfil verde das análises cromatográficas vem crescendo exponencialmente ao longo dos últimos anos, em razão do alto consumo e geração de resíduos dos solventes utilizados. O objetivo deste trabalho é estudar a substituição de solventes tóxicos (metanol, acetonitrila) utilizados na fase móvel da cromatografia líquida por etanol, que é um solvente mais seguro e menos tóxico. No entanto, a utilização do etanol como solvente na fase móvel, deve ser aplicada sem que ocorra a perda do desempenho da análise. Diversos artigos foram encontrados sobre a aplicação do etanol como fase móvel, obtendo uma conclusão positiva, onde o perfil verde foi alcançado e o desempenho da análise não foi prejudicado, em algumas aplicações foi até mesmo melhorado. O estudo comprovou que é possível substituir solventes tóxicos por etanol sem perder o desempenho e reduzindo o consumo, a geração de resíduos, gastos e danos.

Palavras-chave: Química verde. Química analítica. Cromatografia líquida. Cromatografia líquida de alta eficiência. Etanol.

ABSTRACT

The work developed is a literary review on the application of green chemistry in liquid chromatography, more specifically in high performance liquid chromatography. The concern with the green profile of the chromatographic analysis has been growing exponentially over the last few years, due to the high consumption and generation of residues of the solvents used. The objective of this work is to study the substitution of toxic solvents (methanol, acetonitrile) used in the mobile phase of liquid chromatography with ethanol, which is an ecologically correct solvent. However, the use of ethanol as a solvent in the mobile phase must be applied without losing the performance of the analysis. Several articles were found on the application of ethanol as a mobile phase, obtaining a positive conclusion, where the green profile was reached and the performance of the analysis was not impaired, in some applications it was even improved. The study proved that it is possible to replace toxic solvents with ethanol without losing performance and reducing consumption, waste generation, expenses and damage.

Keywords: Green chemistry. Analytical chemistry. Liquid Chromatography. High performance liquid chromatography. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Instrumentação de cromatografia líquida.....	12
Figura 2 - Comparação entre os pictogramas de dois métodos.....	16
Figura 3 - Estratégias que reduzem o consumo de solventes.....	18
Figura 4 - Ranking dos solventes.....	19
Figura 5 - Processo de produção do etanol.....	21
Figura 6 - Impressão digital da <i>C. sylvestris</i> e da <i>B. forficata</i>	25
Figura 7 - Estruturas dos compostos CB (a), CD (b), PB (c), PZ (d), MB (e), SUL (f) CPH (g), CAF (h) e CTH (i).....	27
Figura 8 - Cromatogramas obtidos por HPLC-UV na análise das misturas CB/CD, PB/PZ, SUL/MB e CPH/CAF/CTH.....	29
Figura 9 - Pictograma do perfil verde dos métodos propostos.....	31
Figura 10 - Estruturas dos compostos FAM, PAR e THI.....	32
Figura 11 - Cromatogramas.....	33
Figura 12 - Cromatogramas do método de referência e do método de substituição.	36
Figura 13 - Cromatogramas das análises de EBBpil. com EtOH em diferentes temperaturas.....	37
Figura 14 - Comparação dos cromatogramas do método de referência, simulado, experimental e HPLC preparativa.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desempenho dos detectores para HPLC*	14
Tabela 2 - Valores da Eco-Scala para procedimentos de determinação de cobre.....	17
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos principais solventes usados em cromatografia líquida.....	19
Tabela 4 - Condições cromatográficas usadas nas análises dos extratos de plantas <i>C. sylvestris</i> e <i>B. forficata</i>	23
Tabela 5 - Comparação dos resultados dos métodos utilizando fases móveis diferentes.....	24
Tabela 6 - Condições cromatográficas para análise dos fármacos.....	28
Tabela 7 - Validação dos parâmetros dos métodos propostos para análise de fármacos usando EtOH na fase móvel.....	30
Tabela 8 - Parâmetros de adequação do sistema dos métodos propostos.....	30
Tabela 9 - Condições cromatográficas usadas para análise dos fármacos FAM, PAR e THI.....	32
Tabela 10 - Comparação entre o método verde desenvolvido e os métodos da literatura.....	34
Tabela 11 - Condições cromatográficas usadas para análise do extrato de planta <i>Bidens pilosa</i>	36
Tabela 12 - Condições cromatográficas usadas para análise da EBBpil. com EtOH como FM e em diferentes temperaturas.....	37
Tabela 13 - Comparação dos desempenhos dos métodos desenvolvidos com ACN a 30°C (1) e com EtOH a 30°C (2) e 80°C (3).....	38
Tabela 14 - Conversão das condições isocráticas para gradiente e três composições de fase móvel finais para usar no software.....	40
Tabela 15 - Melhores condições de gradiente e escalonamento de UHPLC via HPLC para pHPLC.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BB	Bilobalídeo
CAF	Cafeína
CB	Brometo de Clidínio (do inglês <i>Clidinium Bromide</i>)
CD	Cloridrato de Clordiazepóxido (do inglês <i>Chlordiazepoxide Hydrochloride</i>)
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CM	Métrica Abrangente para Comparar Métodos de Cromatografia Líquida (do inglês <i>Comprehensive Metric to Compare Liquid Chromatography Methods</i>)
CPH	Cloridrato de Clorfenoxamina (do inglês <i>Chlorphenoxamine Hydrochloride</i>)
CTH	8-Cloroteofilina (do inglês <i>8-Chlorotheophylline</i>)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCE	Demanda Cumulativa de Energia
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EEBpil	Extrato Etanólico de <i>Bidens Pilosa</i>
EHS	Meio ambiente, Saúde e Segurança (do inglês <i>Environment, Health and Safety</i>)
EtOH	Etanol
FAM	Famotidina
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FP	Menos Picos (do inglês <i>Fewer Peaks</i>)
GA	Ginkgolídeo A
GB	Ginkgolídeo B
GC	Ginkgolídeo C

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GCFR	Resposta de Impressão Digital Cromatográfica Verde (do inglês <i>Green Chromatographic Fingerprint Response</i>)
GJ	Ginkgolídeo J
HPLC-EAT	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Ferramenta de Avaliação Ambiental (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography - Environmental Assessment Tool</i>)
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (do inglês <i>International Conference on Harmonization</i>)
LDD	Limite de Detecção
LDQ	Limite de Quantificação
MB	Cloridrato de Mebeverina (do inglês <i>Mebeverine Hydrochloride</i>)
MeOH	Metanol
MP	Mais Picos (do inglês <i>More Peaks</i>)
NEMI	Índice Nacional de Métodos Ambientais (do inglês <i>National Environmental Methods Index</i>)
PAR	Paracetamol
PB	Fenobarbitona (do inglês <i>Phenobarbitone</i>)
PBT	Persistente, Bioacumulativo e Tóxico
PP	Pontos de Penalidade
PZ	Brometo de Pípenzolato (do inglês <i>Pipenzolate Bromide</i>)
QAV	Química Analítica Verde
SUL	Sulpirida
THI	Tiocolquicósido (do inglês <i>Thiocolchicoside</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TTLs	Trilactonas Terpênicas (do inglês <i>Terpene Trilactones</i>)
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Cromatografia líquida (CL).....	11
1.2 Química verde na cromatografia líquida.....	15
1.2.1 Solventes alternativos para FM.....	18
1.3 Obtenção do etanol.....	20
2 REVISÃO E DISCUSSÃO.....	22
2.1 Artigo 1.....	22
2.1.1 Validação do método.....	25
2.1.2 Análise do artigo.....	26
2.2 Artigo 2.....	26
2.2.1 Validação do método.....	30
2.2.2 Perfil verde.....	31
2.2.3 Análise do artigo.....	31
2.3 Artigo 3.....	31
2.3.1 Validação do método.....	33
2.3.2 Perfil verde.....	34
2.3.3 Análise do artigo.....	35
2.4 Artigo 4.....	35
2.4.1 Análise do artigo.....	38
2.5 Artigo 5.....	39
2.5.1 Análise do artigo.....	42
3 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

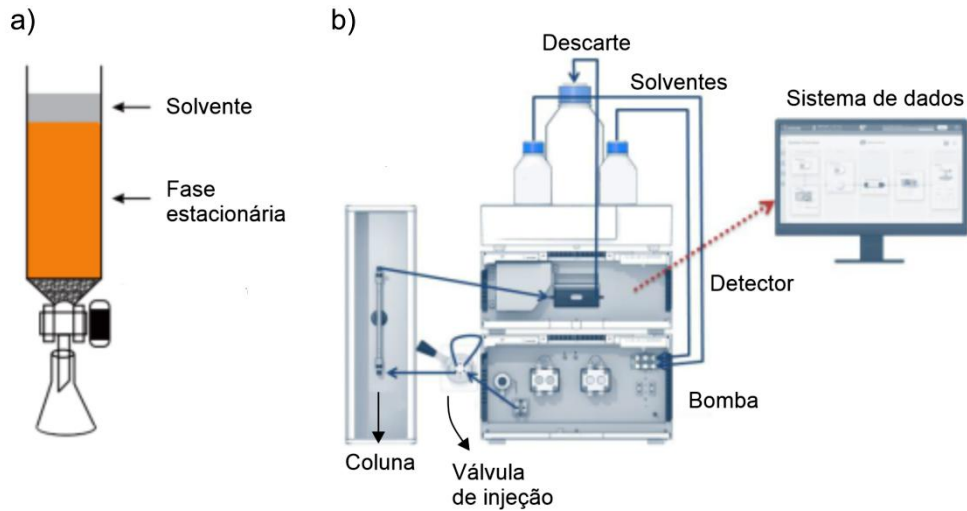
1.1 Cromatografia líquida (CL)

A cromatografia é um poderoso método de separação que encontra aplicação em todos os ramos da ciência. Foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século 20.⁽¹⁾ As aplicações de cromatografia aumentaram exponencialmente por conta da necessidade de análises de misturas complexas e com componentes semelhantes. Com isso, foram desenvolvidas diversas técnicas cromatográficas, dentre elas a cromatografia líquida.

A cromatografia líquida pode ser desenvolvida em coluna ou em camada delgada. A cromatografia em coluna, onde um tubo fino (coluna) é preenchido com partículas de adsorventes (fase estacionária) por onde passa o eluente (fase móvel), realiza a separação dos componentes da amostra através da diferença de interação dos componentes com a fase móvel e a fase estacionária. Durante a eluição, as moléculas do soluto são transportadas através da coluna em uma série contínua de transferência entre as duas fases e, considerando que as moléculas se movem apenas na fase móvel, o tempo de eluição de cada componente depende do tempo que ele permanece nessa fase. Essa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em análises químicas, possui aplicações em diversas áreas, sendo capaz de realizar separação, identificação, purificação e quantificação de compostos em mistura.

Ainda no início, quando a cromatografia líquida estava sendo desenvolvida, os cientistas perceberam que era possível aumentar a eficiência da técnica pela utilização de partículas esféricas e também diminuindo o tamanho das partículas da fase estacionária (FE), embora isso demandasse altas pressões para o bombeamento da fase móvel (FM). Para a aplicação dessas mudanças, foi desenvolvido um equipamento mais sofisticado e conseqüentemente mais caro que os outros métodos de cromatografia, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CLAE segue os princípios básicos da cromatografia líquida, porém, como as colunas são empacotadas com partículas da FE menores (em torno de 3-10 μm), requer colunas de aço que suportam altas pressões (300-400 bars), ao invés das colunas de vidro que gotejam o solvente sob influência da gravidade ou suportam apenas pequenas pressões externas (CL clássica ou de baixa eficiência). E para atender a demanda de vazão de eluente a altas pressões, bombas de precisão e selos de vedação foram também desenvolvidos.

Figura 1 - Instrumentação de cromatografia líquida.



Fonte: Adaptado de a) DEGANI, et al.,1998; e b) DCTECH, 2007.

a) Cromatografia de baixa eficiência: colunas de vidro com diâmetros internos de 10 a 50mm e recheadas com partículas da FE com diâmetros de 150 a 200 μ m. Normalmente FM elui por gravidade ou baixas pressões; b) Cromatógrafo CLAE: colunas de aço com diâmetros internos de 2 a 5mm e 1 a 4,6mm e recheadas com partículas da FE com diâmetros de 3 a 10 μ m. Para se obter vazões satisfatórias o líquido deve ser pressurizado a altas pressões.

Mais tarde, em 2004, foi desenvolvido o método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), com partículas menores que 2 μ m, demandando pressões ainda mais altas, de até 1000 bars. Esta técnica amplificou a resolução, a velocidade e a sensibilidade das análises.

A versatilidade da cromatografia líquida na análise de substâncias em misturas complexas é ampliada pelos vários mecanismos gerais de separação, que incluem principalmente adsorção, absorção, troca iônica, separação por tamanho e por afinidade. Para a análise de substâncias orgânicas de baixa massa molecular, usa-se predominantemente a cromatografia líquida de adsorção e absorção, refletiva em dois modos cromatográficos: modo normal e modo reverso. O modo normal consiste na utilização de uma fase estacionária mais polar do que a fase móvel. Nesse modo cromatográfico os sítios de adsorção presentes na superfície das partículas são grupos polares. Já o modo reverso consiste na utilização de uma fase estacionária menos polar do que a fase móvel. Essas FE são geralmente obtidas pela modificação química da superfície de partículas de sílica, resultando na introdução de grupos apolares. Mecanismos de adsorção (interação dos componentes com a superfície da FE) e absorção (partição dos componentes entre duas fases) são complementares nesse modo cromatográfico, que é mais utilizado em escala analítica. Isto se deve principalmente a sua vasta aplicabilidade, que engloba desenvolvimentos de novos

produtos, o controle de qualidade desses produtos e, também, as possíveis contaminações provenientes desses produtos e dos disponíveis no mercado há anos,⁽⁴⁾ além de análises mais complexas como as necessárias para estudos metabólicos.

Comparada com outras técnicas de separação, a cromatografia líquida apresenta uma alta gama de aplicabilidade, alta precisão e variedade de equipamentos e materiais disponíveis comercialmente, tornando viável o uso da técnica para quase todas as aplicações. A maioria dos laboratórios que realizam análises de misturas químicas são equipados com cromatógrafos líquidos.⁽⁵⁾

A instrumentação da CLAE é composta também por detectores, que são responsáveis por identificar e quantificar as substâncias presentes na amostra conforme a mesma elui pela coluna. Essa detecção pode ser realizada de duas maneiras, respondendo as propriedades da fase móvel (detectores de propriedades universais ou globais) ou respondendo as propriedades do soluto (detectores de propriedades do soluto).

O detector ideal para uma análise de cromatografia líquida deve ter: sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza, resposta rápida independentemente da vazão, alta confiabilidade, fácil uso, similaridade nas respostas e não destruir a amostra.⁽¹⁾ A escolha do detector é importante e depende das características do material a ser analisado e também do tipo de análise que se deseja fazer.

A Tabela 1 lista os detectores mais comuns para CLAE e algumas de suas propriedades.

Tabela 1 - Desempenho dos detectores para CLAE*.

Detector para CLAE	Disponível Comercialmente	LD [†] em Massa (típico)	Faixa Linear [‡] (décadas)
Absorbância	Sim	10 pg	3-4
Fluorescência	Sim	10 fg	5
Eletroquímico	Sim	100 pg	4-5
Índice de refração	Sim	1 ng	3
Condutividade	Sim	100 pg - 1 ng	5
Espectrometria de massas	Sim	< 1 pg	5
Espectroscopia de infravermelho	Sim	1 µg	3
Espalhamento de luz	Sim	1 µg	5
Atividade óptica	Não	1 ng	4
Seletivo a elementos	Não	1 ng	4-5
Fotoionização	Não	< 1 pg	4

Fonte: SKOOG, et al., 2002.

*Do manual do fabricante, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, F. Settle, Ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997; E. S. Yeung e R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, 1986, v. 58, p. 1237A.

[†]Limites de detecção (LD) expressos em massa são dependentes do composto, instrumento e condições da CLAE; os valores fornecidos são típicos de sistemas comerciais, quando disponíveis.

[‡]Valores típicos extraídos da fonte citada.

Os detectores mais usados em CLAE são os baseados na absorvância ultravioleta e visível (UV-vis), fluorescência, índice de refração e espectrometria de massas.

Para a aplicação desta técnica de separação, é necessário o uso de solventes orgânicos para a eluição dos compostos. Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) são os solventes mais utilizados em CL de modo reverso devido às suas características únicas como: dissolução de uma grande variedade de solutos, baixa acidez, baixa reatividade química, baixa absorvância na região do ultravioleta, miscibilidade com água, baixa viscosidade e compatibilidade com a espectrometria de massas. Contudo, apresentam alto nível de toxicidade e impacto ambiental, fazendo com que a quantidade de resíduos gerados e os riscos inerentes destes solventes não devam ser negligenciados. Um cromatógrafo líquido analítico equipado com uma coluna convencional (15-25 cm de comprimento, 4,6 mm d.i., empacotado com partículas de 5 µm), operando a uma vazão de fase móvel de 1 mL/min, produz cerca de 1,5L de resíduos de solventes por dia, o que significa cerca de 500 L de efluente por ano.⁽⁶⁾ Além disso, com os avanços tecnológicos, a utilização de cromatógrafos vem crescendo, por demonstrar melhor desempenho e qualidade nas análises químicas, e conseqüentemente cresce também a quantidade de resíduos gerados.

Portanto, é importante que estudos relacionados à química verde sejam aplicados à cromatografia líquida visando a redução dos impactos ambientais e ocupacionais gerados por esta técnica e sem perder a qualidade da análise.

1.2 Química verde na cromatografia líquida

A química verde é a ciência que, baseada em 12 princípios básicos⁽⁷⁾, tem a preocupação em desenvolver meios capazes de diminuir os impactos causados ao meio ambiente, saúde e segurança, reduzindo ou eliminando substâncias tóxicas geradas pelas indústrias, universidades ou até mesmo por ações comerciais. Tais princípios são:

- 1.Prevenção;
- 2.Economia de átomos;
- 3.Síntese de produtos menos perigosos;
- 4.Desenho de produtos seguros;
- 5.Solventes e auxiliares mais seguros.
- 6.Busca pela eficiência de energia;
- 7.Uso de fontes renováveis de matéria prima;
- 8.Evitar a formação de derivados;
- 9.Catálise;
- 10.Desenho para a degradação;
- 11.Análise em tempo real para a prevenção da poluição;
- 12.Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes.

Com o crescimento do uso da cromatografia líquida, a técnica ganhou a atenção dos pesquisadores para a implementação da Química Analítica Verde (QAV) no desenvolvimento de metodologias analíticas. O objetivo da QAV é reduzir ou eliminar os impactos causados pelas análises químicas sobre o meio ambiente sem prejudicar os parâmetros de desempenho, portanto suas prioridades são: eliminação ou redução de reagentes e solventes, redução de emissões, eliminação de reagentes tóxicos e redução de trabalho e energia.

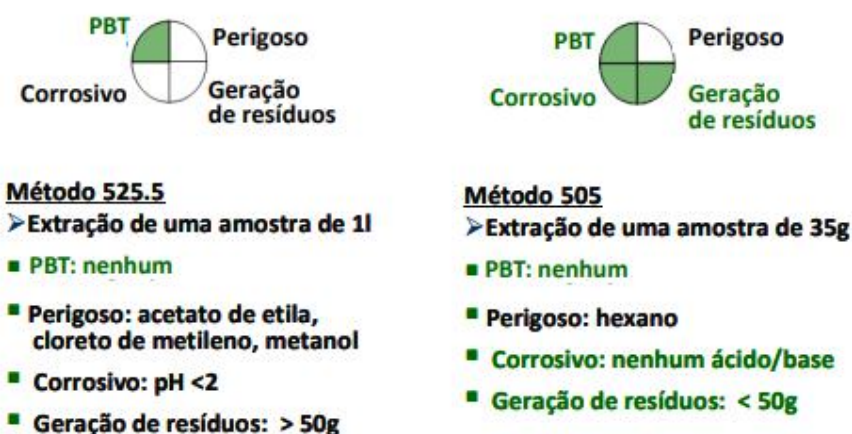
Com base nos princípios da química verde, algumas estratégias são comumente implementadas para obter métodos de cromatografia líquida mais

ecológicos. Elas se concentram na redução do consumo de solvente pela diminuição do comprimento da coluna, diâmetro interno e/ou partícula da coluna; e a substituição de solventes tóxicos e perigosos, como ACN e MeOH, por solventes alternativos menos tóxicos e ambientalmente mais corretos. As técnicas cromatográficas têm o potencial de serem mais verdes em todas as etapas da análise, desde a coleta e preparação da amostra, até a separação e determinação.⁽⁸⁾

Apesar de todas as estratégias tornarem o método mais verde, algumas podem ser mais eficientes do que outras, portanto, foram desenvolvidos métodos de avaliação para estimar o quão verde são essas estratégias quando aplicadas aos métodos analíticos. As ferramentas de avaliação mais conhecidas são a rotulagem *National Environmental Methods Index* (NEMI) e a Eco-escala analítica.

A rotulagem NEMI é um banco de dados que resulta em um pictograma de fácil leitura que classifica os métodos analíticos de acordo com quatro critérios: PBT (persistente, bioacumulativo e tóxico), corrosivo (pH < 2 ou > 12), perigoso e resíduos (> 50g). Como exemplo, a imagem abaixo compara dois métodos para determinação de pesticidas orgânicos na água, utilizando cromatografia gasosa.⁽⁹⁾

Figura 2 - Comparação entre os pictogramas de dois métodos.



Fonte: OLIVEIRA, B. F., 2012.

O quadrante verde preenchido, indica que o método analítico atende ao respectivo critério, ou seja, é “verde” neste quesito. E como pode ser observado na imagem, o método 505 é o mais “verde” para essa análise, por possuir mais quadrantes preenchidos.

A Eco-escala analítica é uma abordagem mais quantitativa, com base na subtração de pontos de penalidade de um total de 100, com base na quantidade e risco de reagentes, consumo de energia, riscos ocupacionais e quantidade de resíduos gerados. O resultado é classificado como:

- > 75 representa uma excelente análise verde
- > 50 representa uma análise verde aceitável
- < 50 representa análise verde inadequada

Como exemplo, a tabela abaixo compara 3 procedimentos de determinação de Cu em uma amostra de latão.⁽¹⁰⁾

Tabela 2 - Valores da Eco-Escala para procedimentos de determinação de cobre.

Método	Pontos de penalidade (PP)		Total de PP	Eco-escala
	Reagentes	Instrumentos		
Titulação	17	13	30	70
Eletrogravimetria	17	10	27	73
Espectrometria de Absorção Atômica	14	15	29	71

FONTE: GALUSKA, et al., 2012.

Todos os métodos possuem valores de Eco-escala semelhantes, porém, de acordo com a Tabela 2, o método eletrogravimétrico é o mais verde (73 na Eco-escala) seguido pela espectrometria de absorção atômica (71 na Eco-escala) e por último a titulação (70 na Eco-escala).

Em 2014, Funari, et al.⁽¹¹⁾ desenvolveram um outro método de avaliação para estimar o quão verde são as análises cromatográficas, o *Green Chromatographic Fingerprint Response* (GCFR). Este método é baseado em fatores relacionados ao desempenho da separação cromatográfica e está representado na equação (1) abaixo. A equação contém três termos complementares e foi projetada para maximizar o número de picos e sua distribuição ao longo de todo o cromatograma ao mesmo tempo em que tenta maximizar o número de picos por minuto de análise.⁽¹¹⁾

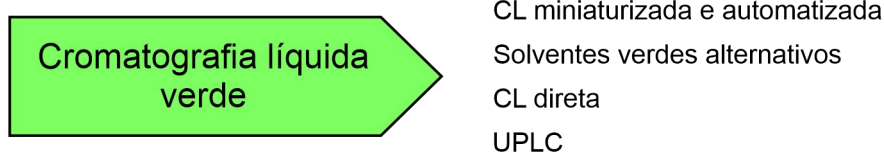
$$GCFR = \pi^x \left(\frac{FP}{MP} \right) \left(\frac{n}{t} \right) \quad (1)$$

Onde n é o número total de picos, x é o expoente de n (indica o peso atribuído a ele), t é o tempo total de execução, *fewer peaks* (FP) é o número de picos na seção do cromatograma com menos picos e *more peaks* (MP) é o número de picos na seção do cromatograma de igual comprimento, mas com mais picos (FP/MP indica como uniformemente esta informação é distribuída entre seções iguais do cromatograma).

Quanto mais alta a pontuação GCFR para uma determinada corrida, melhor, pois significa uma separação mais eficiente, como pode ser observado nos exemplos apresentados em itens subsequentes.

Algumas estratégias para reduzir o consumo de solventes orgânicos estão representadas na Figura 3. Para algumas implementações, é necessário modificar a instrumentação cromatográfica, o que pode tornar o método mais caro e/ou mais complexo. Por isso, uma boa tática é a substituição de solventes tóxicos por solventes verdes alternativos, como o etanol por exemplo. O etanol é um solvente ambientalmente amigável e com características favoráveis para as análises de cromatografia líquida. Com isso, muitos estudos estão sendo feitos para sua aplicação como solvente orgânico na fase móvel da CL e a maioria deles demonstraram bons resultados.

Figura 3 - Estratégias que reduzem o consumo de solventes.



Fonte: Autor.

1.2.1 Solventes alternativos para FM

Para que as análises cromatográficas sejam mais sustentáveis, uma das opções é a substituição de solventes nocivos por solventes mais “verdes”. Um artigo publicado em 2014,⁽¹²⁾ fez uma combinação dos dados divulgados por algumas instituições que categorizaram os solventes de acordo com sua periculosidade.

A combinação dos dados resultou em um ranking dos solventes mais e menos recomendados para se utilizar em análises químicas.

Figura 4 - Ranking dos solventes.

Recomendado	Água, EtOH, i-PrOH, 1-BuOH, EtOAc, i-PrOAc, n-BuOAc, anisol, sulfolano.
Recomendado ou problemático?	MeOH, 2-BuOH, t-BuOH, álcool benzílico, etilenoglicol, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, ciclohexanona, MeOAc, AcOH, Ac ₂ O.
Problemático	Me-THF, heptano, Me-ciclohexano, tolueno, xileno, clorobenzeno, acetonitrila, DMPU, DMSO.
Problemático ou perigoso?	MTBE, THF, ciclohexano, DCM, ácido fórmico, piridina.
Perigoso	Éter di-isopropílico, 1,4-dioxano, DME, pentano, hexano, DMF, DMAc, NMP, metoxietanol, TEA.
Altamente perigoso	Éter dietílico, benzeno, clorofórmio, CCL ₄ , DCE, nitrometano.

Fonte: Adaptado de PRAT, et al., 2014.

O ranking apresenta algumas opções de solventes “verdes”, porém, para que o solvente seja utilizado na cromatografia líquida, ele precisa ter certas propriedades físico-químicas que fazem com que a análise seja eficiente.

Na tabela abaixo, foram selecionadas algumas propriedades mais importantes na escolha do solvente para a cromatografia líquida.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos principais solventes usados em cromatografia líquida.

Solvente	Solubilidade em água	Limite operacional UV	Viscosidade (a 25°C)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)
Metanol	miscível	210 nm	0,544 mPa.s	-97,5	64,5
Etanol	miscível	210 nm	1,074 mPa.s	-114,1	78,2
Isopropanol	miscível	210 nm	2,040 mPa.s	-87,9	82,2
1-butanol	solúvel	215 nm	2,540 mPa.s	-88,6	117,6
2-butanol	muito solúvel	260 nm	3,100 mPa.s	-88,4	99,4
Isobutanol	solúvel	230 nm	3,330 mPa.s	-102	107,8
1-propanol	miscível	210 nm	1,945 mPa.s	-124,4	97,0
Acetonitrila	miscível	190 nm	0,369 mPa.s	-44	81,6
Acetona	miscível	330 nm	0,306 mPa.s	-94,9	56,1

Fonte: HAYNES, 2016.

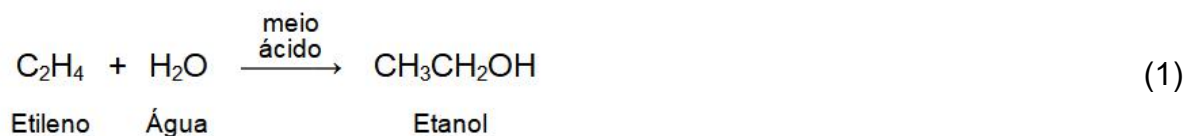
O metanol e a acetonitrila são os solventes que possuem as melhores características para análises cromatográficas, devido aos baixos valores de *cut-off* e

viscosidade. Entretanto, eles não são os mais recomendados de acordo com o ranking da Figura 4.

Com isso, o etanol, é o solvente que possui maior semelhança com as propriedades do metanol e, portanto, é uma boa escolha para as análises cromatográficas, além de ser altamente recomendado de acordo com o ranking de periculosidade.

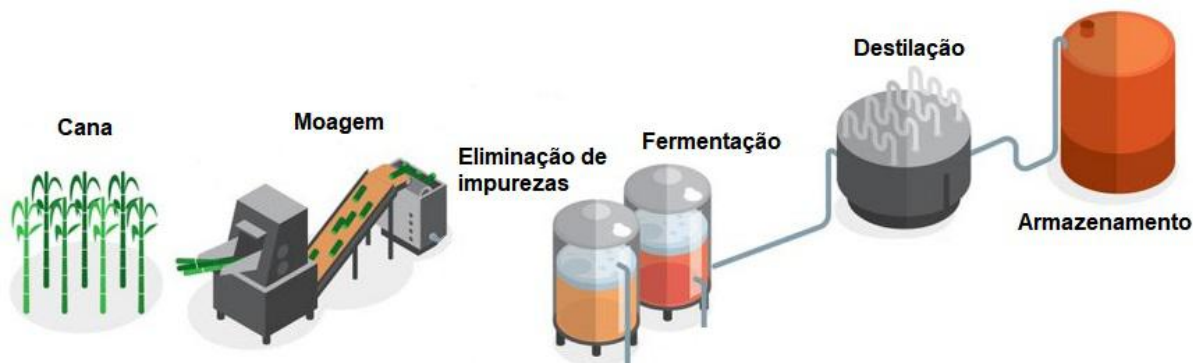
1.3 Obtenção do etanol

O etanol é uma substância orgânica que pode ser obtida por duas vias diferentes: fermentação ou síntese química. Na síntese química, o etanol é formado através da hidratação do etileno (composto derivado do petróleo, hulha ou gás natural) por meio da reação (1). Na fermentação, ele é formado através da via fermentativa de matérias-primas ricas em açúcares, como: cana de açúcar, milho, beterraba, batata, celulose, entre outras. A Figura 5 representa o processo mais utilizado no Brasil para a produção de etanol, a fermentação da cana de açúcar.



O processo sintético para obtenção do etanol não provém de fontes renováveis, ou seja, provém de fontes esgotáveis e algumas inclusive geram substâncias tóxicas e causam grandes impactos ambientais. Com isso, ao longo dos últimos anos, houve uma crescente busca pela substituição dessas fontes não renováveis por fontes renováveis e mais verdes, como por exemplo, as matérias primas citadas no processo de fermentação, por serem plantas cultivadas.

Figura 5 - Processo de produção do etanol.



Fonte: OLIVEIRA, M., 2012.

Este processo de produção de etanol de cana-de-açúcar se divide nas seguintes etapas:⁽¹⁵⁾

- Lavagem: retira poeira, areia, terra e outros tipos de impurezas.
- Moagem: a cana é moída por trituradores, produzindo um líquido chamado melado e separando da parte sólida (bagaço).
- Eliminação de impurezas: o melado é peneirado e em seguida passa por uma clarificação (decantação das impurezas). Depois de clarificado o caldo é esterilizado através do aquecimento.
- Fermentação: o caldo é misturado com as leveduras que quebram as moléculas de glicose e produzem etanol e vinho fermentado.
- Destilação: para separar o etanol do vinho fermentado, é necessário aquecer a mistura até a evaporação do etanol seguida pela condensação.
- Desidratação: o álcool hidratado passa por uma desidratação para formar o álcool anidro.
- Armazenamento: o etanol é armazenado em tanques até ser levado pelas distribuidoras.

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol proveniente da fermentação da cana de açúcar, já que essa matéria prima é abundante no país e pela necessidade de reduzir a dependência do petróleo e da emissão de gases tóxicos.⁽¹⁶⁾

2 REVISÃO E DISCUSSÃO

2.1 Artigo 1

O primeiro artigo a ser discutido é o “*Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices*”⁽¹⁷⁾ que tem como objetivo avaliar um novo método de análise para dois extratos de plantas, *Bauhinia forficata* e *Casearia sylvestris*, em relação a qualidade de separação e impactos *Environment, Health and Safety* (EHS).

Nesse artigo é utilizado um método chamado cromatografia de impressão digital, que utiliza o padrão distinto dos picos de um cromatograma para avaliar a qualidade e identidade das amostras, principalmente para materiais fitoterápicos.

A CLAE é a técnica de separação mais indicada para análise de extratos de plantas devido a sua alta eficiência e simplicidade. No entanto, por conta da alta quantidade de solventes perigosos descartados, os autores propuseram um método mais verde utilizando etanol.

Para otimizar o método e obter uma melhor resposta, foram realizados testes experimentais e cálculos estatísticos, a fim de prever as condições cromatográficas ideais. Estas condições foram utilizadas no método de referência e adaptadas no método verde, pois devido a substituição do MeOH e ACN por EtOH, as forças eluotrópicas tiveram que ser ajustadas.

Na Tabela 4, estão listadas as condições cromatográficas dos métodos de referência (estatisticamente otimizados) e dos métodos mais verdes para as duas amostras.

Tabela 4 - Condições cromatográficas usadas nas análises dos extratos de plantas *C. sylvestris* e *B. forficata*.

	<i>C. sylvestris</i>		<i>B. forficata</i>	
	Referência	Verde	Referência	Verde
Método				
Detector	UV			
Coluna	C18 Synergi Hydro-RP (250 x 4.6 mm; 4 µm)			
Concentração da amostra	20 mg/mL			
Limite Operacional UV	254 nm		340 nm	
Fase Móvel	H ₂ O e MeOH	H ₂ O e EtOH	H ₂ O/H ₃ PO ₄ 100:0,05% v/v (pH 2.88) e ACN	Tampão de acetato pH 4.0 e EtOH
Gradiente	3,3-100% de MeOH	2,7-83,7% de EtOH	10-40% de ACN	3,3-58% de EtOH
	61,8 min	61,8 min	25 min	40 min
Isocrático	10 min	10 min	-	-
Vazão	0,7 mL/min	0,7 mL/min	0,8 mL/min	0,7 mL/min

Fonte: FUNARI, et al., 2014b.

Para ambos os extratos, vazões de até 0,8 mL/min foram utilizadas sem exceder a pressão de 270 bar da CLAE, até mesmo com o EtOH como fase móvel. Além disso, a análise do extrato de *Sylvestris* pelo método verde, reduziu em 16,4% o consumo do solvente orgânico, devido a maior força eluotrópica do etanol em relação ao metanol.

Para medir e comparar a eficiência de separação e os impactos ambientais dos métodos acima, foram utilizadas duas equações, GCFR e HPLC - *Environmental Assessment Tool* (HPLC-EAT). A primeira é uma função de resposta para a separação de matrizes complexas e a segunda estima o impacto EHS dos solventes. A razão entre os valores GCFR e HPLC-EAT resulta em uma pontuação final que abrange a qualidade de separação (alto valor GCFR indica melhor método) e os impactos EHS (menor valor HPLC-EAT indica menor impacto). Sendo assim, valores mais elevados de GCFR/HPLC-EAT indicam o desempenho superior de um método.

Tabela 5 - Comparação dos resultados dos métodos utilizando fases móveis diferentes.

Extrato	Método (solvente B)	GCFR	HPLC-EAT	GCFR / HPLC-EAT
<i>C. sylvestris_L</i>	Validado (EtOH)	16626 ± 445	78	214 ± 6
	Referência (MeOH)	17936 ± 520	91	198 ± 6
<i>B. forficata_L</i>	Validado (EtOH)	7528 ± 580	43	175 ± 13
	Referência (ACN)	5416 ± 332	46	118 ± 7

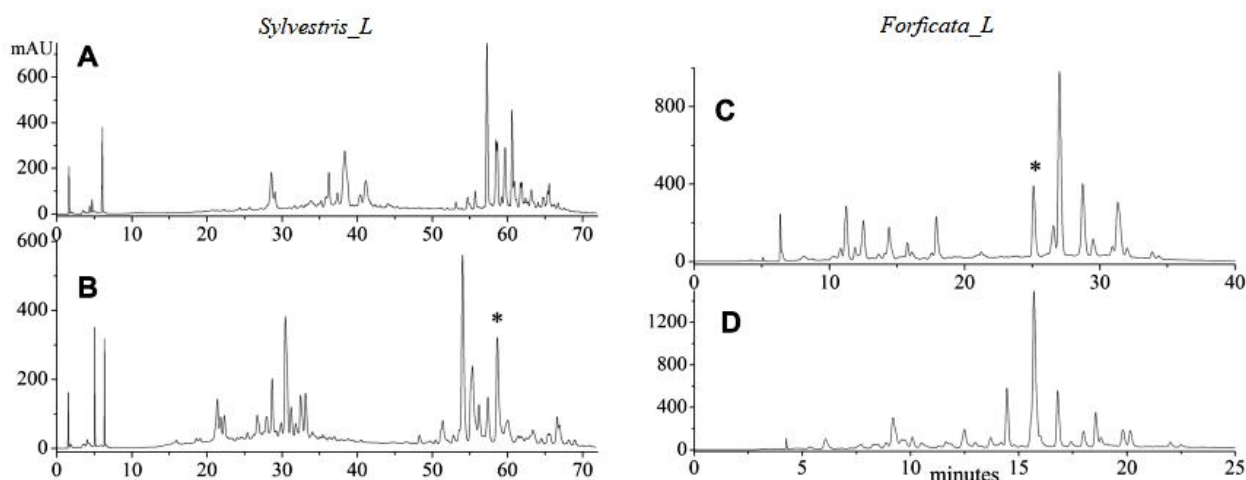
Fonte: FUNARI, et al., 2014b.

De acordo com a Tabela 5, para a análise do extrato *C. sylvestris_L*, o método em que foi utilizado EtOH foi superior ao método com MeOH. Apesar deste último ter tido uma melhor separação, de acordo com o valor GCFR mais alto, a diferença entre os valores HPLC-EAT foram mais favoráveis ao etanol, que por ser um método bem mais verde sobressai no valor líquido final.

Na análise do extrato *B. forficata_L*, o método proposto utilizando EtOH também foi superior ao método de referência. Entretanto, diferentemente do exemplo anterior, neste caso o EtOH foi ligeiramente mais verde do que a ACN, mas foi muito mais eficiente na separação, resultando em um valor líquido mais pronunciado.

Os cromatogramas de impressão digital geralmente são complexos e, como são utilizados como perfis de comparação, precisam ter boa resolução de pico e separação. Na Figura 6, ao comparar os cromatogramas do método de referência e do método verde, é possível observar que para o extrato de *C. sylvestris* (Fig. 6a e b) o método verde possui maior número de picos e melhor resolução, principalmente entre 20 e 40 minutos. Já nos cromatogramas do extrato de *B. forficata* (Fig. 6c e d), o método verde obteve um tempo de análise mais demorado, porém com maior quantidade de picos e muito mais definidos, além de melhor separação.

Figura 6 - Impressão digital da *C. sylvestris* e da *B. forficata*.



Fonte: FUNARI, et al., 2014b.

A) Impressão digital da *sylvestris_L* utilizando MeOH como fase móvel; B) Impressão digital da *sylvestris_L* utilizando EtOH como fase móvel; C) Impressão digital da *forficata_L* utilizando EtOH como fase móvel; e D) Impressão digital da *forficata_L* utilizando ACN como fase móvel.

2.1.1 Validação do método

Quando um método novo é desenvolvido ou um método conhecido é adaptado, é necessário realizar a sua validação. A validação é uma avaliação que deve garantir que este método atenda às exigências mínimas das aplicações analíticas, que seja eficiente em análises de rotina e que seja adequado para seu propósito.

A determinação da impressão digital não é um método quantitativo, portanto os parâmetros avaliados e os aspectos de validação são diferentes dos métodos comuns.⁽¹⁸⁾ Para avaliar a qualidade do método, foram utilizados o desvio padrão relativo (DPR) do tempo de retenção relativo, para picos com área >4% da soma de todas as áreas dos picos, e o DPR da resposta GCFR.

A estimativa da precisão instrumental foi realizada para nove injeções consecutivas da mesma amostra. Para *C. sylvestris*, o DPR dos tempos de retenção relativos foi 0,94 e do GCFR foi 9,54%. Para *B. forficata*, os valores foram 0,47 e 7,70%, respectivamente.

A repetibilidade foi calculada com base em nove experimentos, variando a concentração em três níveis e realizando em triplicata. Para *C. sylvestris*, o DPR dos tempos de retenção relativos foi 0,73 e do GCFR foi 7,50%. Para *B. forficata*, os valores foram 1,12 e 9,17%, respectivamente.

A precisão intermediária foi calculada através de amostras preparadas em três dias diferentes, por dois analistas diferentes, com concentrações (10, 15 e 20 mg/mL) e volume de injeção (10, 15 e 20 μ L). Para *C. sylvestris*, o DPR dos tempos de retenção relativos foi 0,78 e do GCFR foi 13,8%. Para *B. forficata*, os valores foram 0,69 e 14,83%, respectivamente.

2.1.2 Análise do artigo

Devido a necessidade de desenvolver métodos de análises mais verdes, o etanol foi escolhido para compor a fase móvel por ser uma opção mais ecologicamente amigável, sendo um solvente biodegradável, obtido de fontes renováveis e menos tóxico do que os outros solventes.

A característica negativa (alta viscosidade) do etanol, foi contornada através da redução da vazão da fase móvel, para que a pressão do sistema não fosse muito alta. Esta adaptação não afetou o desempenho da análise, concluindo então que o método com EtOH é aplicável.

De acordo com os cromatogramas e cálculos obtidos no artigo, os métodos desenvolvidos utilizando etanol demonstraram um melhor desempenho do que os realizados com metanol e acetonitrila. Além dos bons resultados obtidos nas análises com etanol, o artigo demonstrou que é possível desenvolver métodos mais sustentáveis e eficazes sem modificar a instrumentação, apenas com a aplicação de estratégias simples, tornando a modificação viável.

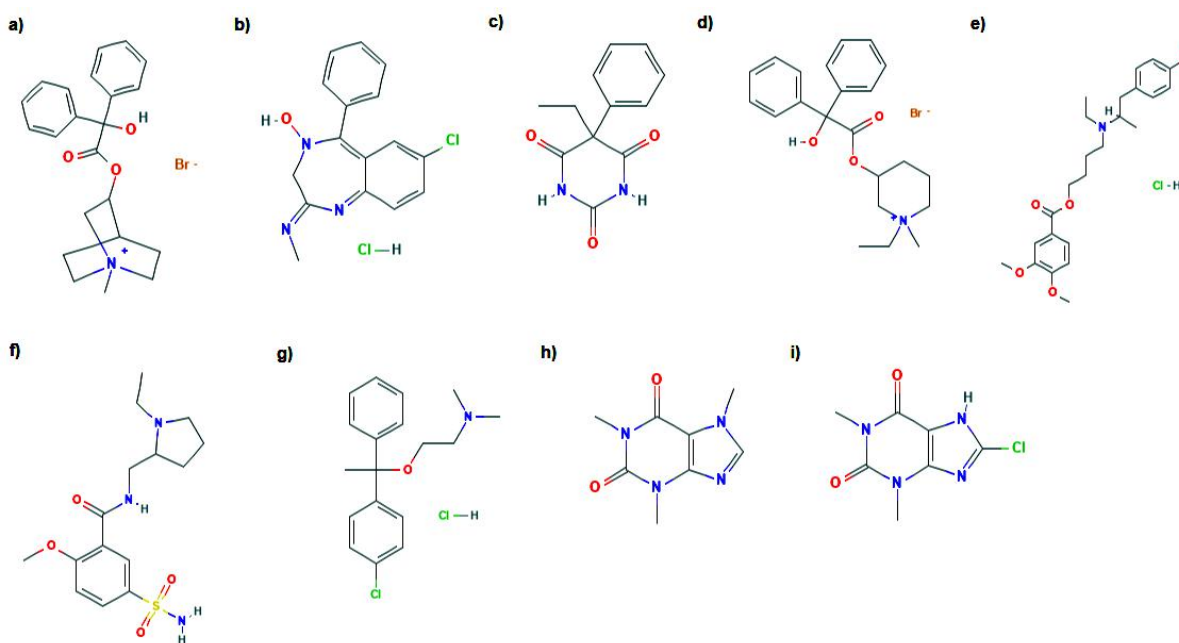
2.2 Artigo 2

O segundo artigo a ser discutido é o “*Validated green high-performance liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: A comparison with reported conventional methods*”⁽¹⁹⁾ que tem como objetivo comprovar que os métodos convencionais podem ser substituídos por outros mais ecológicos com os mesmos parâmetros analíticos.

Nesse artigo, para contornar as problemáticas causadas por solventes tóxicos em relação aos impactos ambientais e à saúde, as estratégias utilizadas foram: a substituição de solventes tóxicos por etanol e a redução do tempo de análise para produzir o mínimo de resíduos possíveis.

Quatro formulações farmacêuticas foram escolhidas como modelos para este estudo: brometo de clidínio (CB) e cloridrato de clordiazepóxido (CD); fenobarbitona (PB) e brometo de pipenzolato (PZ); sulpirida (SUL), cloridrato de mebeverina (MB) e cloridrato de clorfenoxamina (CPH); cafeína (CAF); 8-cloroteofilina (CTH).

Figura 7 - Estruturas dos compostos CB (a), CD (b), PB (c), PZ (d), MB (e), SUL (f) CPH (g), CAF (h) e CTH (i).



Fonte: NATIONAL, 2004.

Estrutura do a) brometo de clidínio b) cloridrato de clordiazepóxido c) fenobarbitona d) brometo de pipenzolato e) cloridrato de mebeverina f) sulpirida g) cloridrato de clorfenoxamina h) cafeína e i) 8-corteofilina.

Soluções padrão de cada composto foram preparadas com as seguintes concentrações: CB, CD, MB, SUL, CPH, CAF, e CTH (100 µg/mL) preparadas com etanol e PB e PZ (200 µg/mL) preparadas com etanol.

Para a construção da curva analítica, foram preparadas uma série de misturas de solução para cada combinação, fazendo a diluição apropriada com etanol. Para a mistura contendo CB e CD foram 0,5-40 µg/mL de CB e 0,8-30 µg/mL de CD, para a mistura contendo PB e PZ, foram 1,5-40 µg/mL de PB e 1-35 µg/mL de PZ, para a mistura contendo MB e SUL, foram 1-40 µg/mL de MB e de SUL e para a mistura contendo CPH, CAF, e CTH, foram 1-70 µg/mL de CPH, 1,5-35 µg/mL de CAF e 1-40 µg/mL de CTH.

Segue abaixo na Tabela 6, as condições cromatográficas em que as análises foram realizadas.

Tabela 6 - Condições cromatográficas para análise dos fármacos.

	CB/CD	PB/PZ	MB/SUL	CPH/CAF/CTH
Coluna	CLAE Zorbax SB C18 (4,6 mm x 75 mm id, 3,5 µm)			Polaris SI (4,6 mm x 50 mm id, 3 µm)
Concentração Solução padrão	100 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
Modo de eluição	isocrático	isocrático	isocrático	isocrático
Fase móvel	EtOH/H ₂ O (50:50 v/v)	EtOH/H ₂ O (50:50 v/v)	EtOH/H ₂ O (94,5:5,5 v/v)	EtOH (100%)
Vazão	0,5 mL/min	0,5 mL/min	0,8 mL/min	0,4 mL/min
Injeção	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	1,0 µL
Limite operacional UV	210 nm	220 nm	220 nm	220,4/ 270,4/ 276,4 nm

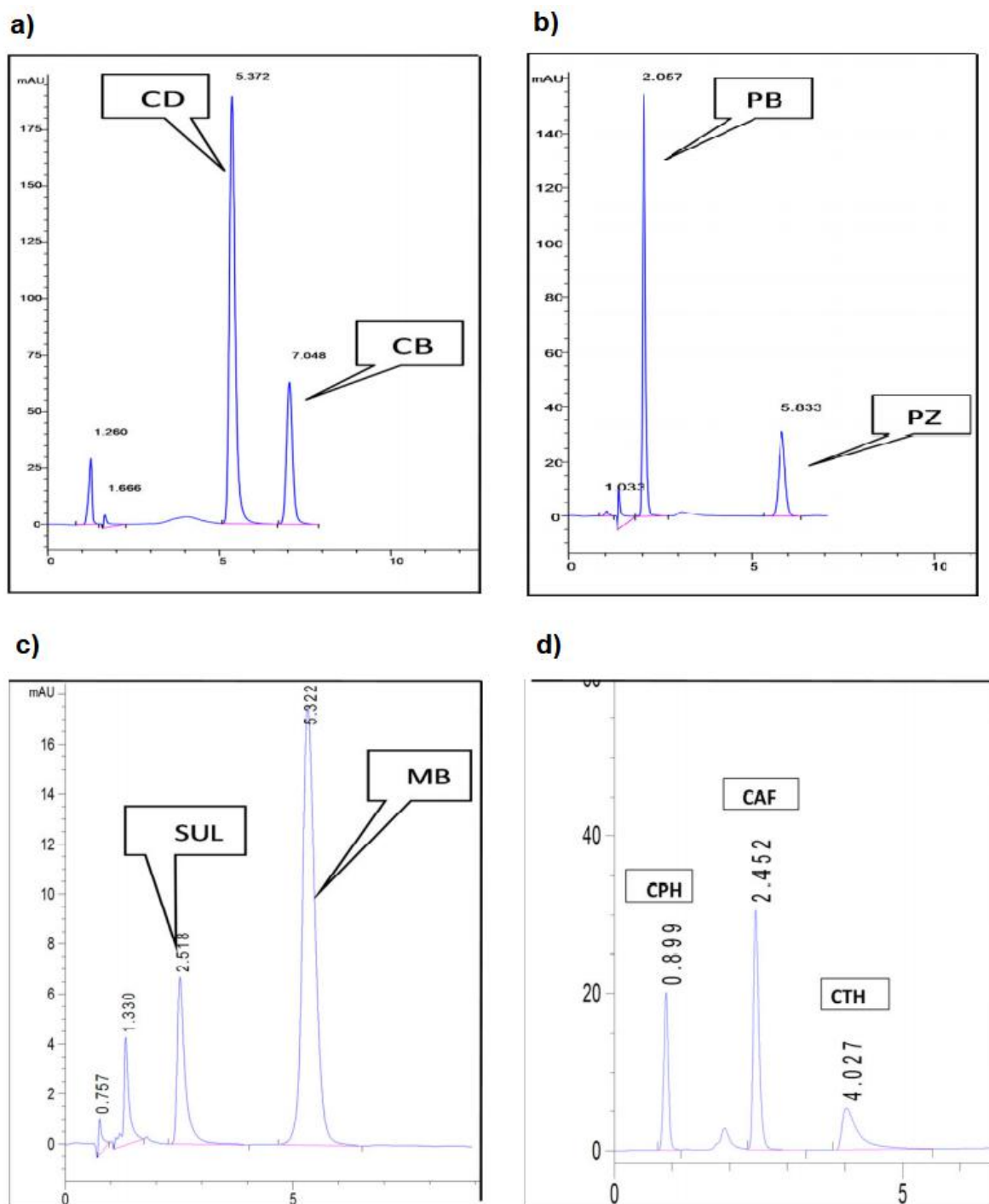
Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

As amostras foram preparadas a partir de comprimidos ou gotas diluídos em etanol, a fim de obter as seguintes soluções: 12,5 µg/mL de CB e 25,0 µg/mL de CD; 18,0 µg/mL de PB e 12,0 µg/mL de PZ; 40,0 µg/mL de MB e 10,0 µg/mL de SUL; e 12,0 µg/mL de CPH, 20,0 µg/mL de CAF e 8,0 µg/mL de CTH.

As amostras foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas da curva de calibração e suas concentrações foram calculadas a partir de suas respectivas equações de regressão.

Os cromatogramas obtidos, apresentados na Figura 8, demonstram boa separação e simetria de pico, além de tempos de retenção bem baixos.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV na análise das misturas CB/CD, PB/PZ, SUL/MB e CPH/CAF/CTH.



Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

a) Mistura CB/CD usando fase móvel EtOH/água (50:50 v/v) com vazão 0,5 mL/min; b) Mistura PB/PZ usando fase móvel EtOH/água (50:50 v/v) com vazão 0,5 mL/min; c) Mistura SUL/MB usando fase móvel EtOH/água (94,5:5,5 v/v) com vazão 0,8 mL/min; e d) Mistura CPH/CAF/CTH usando fase móvel EtOH (100%) com vazão 0,4 mL/min.

2.2.1 Validação do método

Os métodos foram validados de acordo com as diretrizes *International Conference on Harmonization (ICH)*⁽²¹⁾ e apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Validação dos parâmetros dos métodos propostos para análise de fármacos usando EtOH na fase móvel.

Parâmetros	Método proposto								
	CB	CD	PB	PZ	MB	SUL	CPH	CAF	CTH
Faixa de linearidade (µg/mL)	0,5-40	0,8-30	1,5-40	1-35	1-40	1-40	1-70	1,5-35	1-40
Exatidão^{a)} (Média ± DP%)	99,6±1,15	100,3±1,12	100,5±0,42	99,8±0,27	99,8±0,85	99,3±0,89	100,1±0,49	99,5±1,52	100,2±0,35
Precisão^{a)} (Repetibilidade)	99,5±1,5	99,9±0,9	99,9±0,9	100,8±0,4	99,3±0,4	98,4±0,5	100,1±0,6	100,3±0,7	100,8±0,8
Precisão intermediária	99,7±1,1	99,9±0,2	100,2±0,3	100,1±1,0	99,7±0,3	98,9±0,8	100,2±0,6	99,8±0,7	100,4±0,8
LDD (µg/mL) ^{b)}	0,09	0,22	0,43	0,09	0,10	0,05	0,18	0,44	0,31
LDQ (µg/mL) ^{b)}	0,30	0,72	1,40	0,29	0,33	0,18	0,59	1,47	1,02
Regressão									
Inclinação	47,43	74,25	40,04	23,28	16,95	16,04	6,55	6,59	8,81
Interceptação	4,22	35,02	11,78	9,39	-1,42	-0,01	-2,20	2,68	2,32
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9998	0,9998	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998

Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

a) $n=9$, *Validação foi feita de acordo com a Validação de Texto e Metodologia de Procedimentos Analíticos ICH.

b) O LDD e LDQ foram calculados a partir de $k DP/b$ onde $k=3$ para LDD e 10 para LDQ, DP é o DP de intercepções y, e b é a inclinação da curva de calibração.

Os parâmetros de adequação do sistema foram avaliados de acordo com os requisitos da *United States Pharmacopeia (USP)*⁽²²⁾ e apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de adequação do sistema dos métodos propostos.

Parâmetros	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Método proposto	Valores de referência ^{a)}
	CB	CD	PB	PZ	MB	SUL	CPH	CAF	CTH	
Tempo de retenção (min)	7,05	5,38	2,06	5,86	5,32	2,52	3,58	2,47	0,88	
Resolução (Rs)	5,42	16,15	5,11	16,02	7,39	5,54	6,06	6,23	6,41	Rs > 2
Seletividade (α)	1,43	2,06	2,70	7,72	2,77	4,01	3,62	3,10	4,03	$\alpha > 1$
Simetria	0,88	0,77	0,77	0,94	0,84	0,52	0,42	0,69	0,62	≤ 1
Pratos teóricos (N)	5149	7829	2809	5440	2118	2071	2169	3293	2134	N > 2000

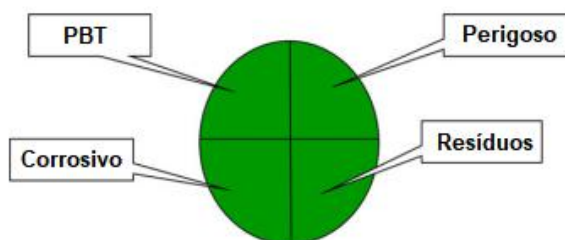
Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

a) Todos os parâmetros de acordo com o *Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drugs Administration. Reviewer Guidance, Validação de Métodos Cromatográficos*; FDA, Rockville, MD; (1994).

2.2.2 Perfil verde

Para avaliar o perfil verde dos métodos propostos, foram utilizados alguns bancos de dados para classificar os métodos de acordo com a rotulagem NEMI, gerando um pictograma.

Figura 9 - Pictograma do perfil verde dos métodos propostos.



Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

Todos os métodos propostos apresentaram os quatro quadrantes preenchidos no quesito perfil verde.

Além disso, comparando os métodos propostos com os métodos relatados, os métodos propostos resultaram em uma geração de resíduos consideravelmente menor, com menor vazão e tempo de análise.

2.2.3 Análise do artigo

Os métodos propostos resultaram em cromatogramas com ótimas resoluções, passaram em todos os critérios do perfil verde e foram validados com relação à linearidade, precisão, exatidão, adequação e robustez do sistema.

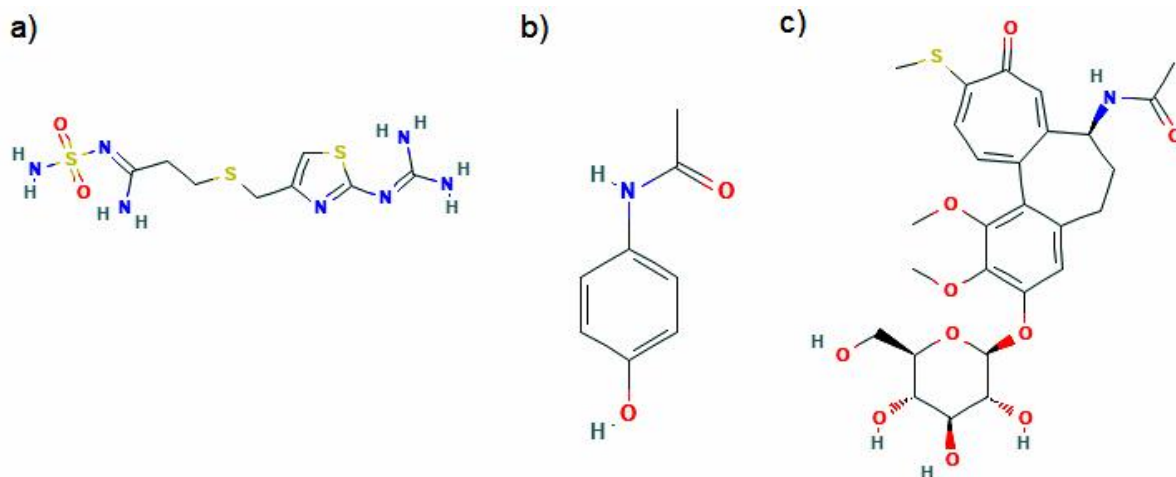
Os resultados apresentados provam que os métodos verdes para a determinação de CB/CD, PB/PZ, MB/SUL e CPH/CAF/CTH podem substituir os métodos convencionais e podem ser utilizados para análises de rotina com uma grande redução do impacto ambiental.

2.3 Artigo 3

O terceiro artigo a ser discutido é o *“Application of green methodology to pharmaceutical analysis using eco-friendly ethanol-water mobile phases”*⁽²³⁾ que tem como objetivo demonstrar a aplicabilidade de análises verdes em CLAE substituindo solventes tóxicos por etanol.

Para este estudo foram selecionados três ingredientes farmacêuticos ativos: famotidina (FAM), paracetamol (PAR) e tiocolquicosido (THI). Devido às estruturas destes ingredientes possuírem ligações com O, N e S (polares), foi selecionada a coluna C8, mais polar do que a C18, para realizar as análises.

Figura 10 - Estruturas dos compostos FAM, PAR e THI.



Fonte: NATIONAL, 2004.

As condições cromatográficas foram otimizadas e estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas usadas para análise dos fármacos FAM, PAR e THI.

Temperatura do forno	30°C
Coluna	C8 (150 x 4,6mm x 5µm)
Volume de injeção	20 µL
Vazão	1,0 mL/min
Fase móvel	Di-hidrogenofosfato de sódio (pH 4,6; 5mM, componente A) EtOH (95:5, v/v, componente B)
Modo de eluição	Gradiente
Limite operacional DAD	254 nm

Fonte: DOGAN, et al., 2020.

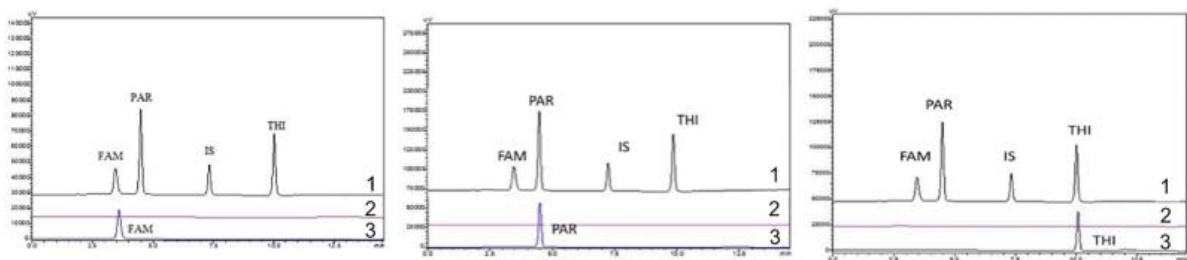
O gradiente de eluição utilizado foi: 5% B em 0 min., 20% B em 7,5 min., 45% B em 12 min. e 20% B em 13 min. A vazão foi alterada para 1,5 mL/min em 7,5 min. Após cada análise, as condições iniciais foram restauradas ao longo de 5 minutos.

Soluções padrão foram preparadas com as seguintes concentrações: FAM (15 µg/mL), PAR (15 µg/mL), THI (15 µg/mL) e cafeína (CAF) como padrão interno (10 µg/mL).

As amostras foram preparadas a partir de comprimidos e diluídas em fase móvel, a fim de obter soluções de 15 µg/mL para cada analito.

Os cromatogramas obtidos, apresentados na Figura 11, demonstraram boa separação e simetria de pico.

Figura 11 - Cromatogramas.



Fonte: DOGAN, et al., 2020.

Cromatogramas representativos para (1) padrões contendo FAM (15 µg/mL), PAR (15 µg/mL), THI (15 µg/mL) e padrão interno (10 µg/mL), (2) soluções de comprimidos de placebo e (3) solução (15 µg/mL) do comprimido de cada analito.

2.3.1 Validação do método

O método proposto utilizando fase móvel contendo etanol foi validado de acordo com as diretrizes ICH⁽²¹⁾.

A seletividade foi examinada a partir dos cromatogramas de cada analito (Figura 11).

As curvas de calibração foram construídas na faixa de 1,0-100,00 µg/mL. As faixas de trabalho foram escolhidas entre 5 e 30 µg/mL. Os coeficientes de correlação foram todos acima de 0,999 (n=6).

A exatidão foi avaliada em termos de erros relativos obtidos a partir dos experimentos realizados em três níveis de concentração. Não houve erro relativo calculado maior que 2, apresentando alta exatidão do método desenvolvido. Estudos de exatidão também foram realizados para análises de recuperação dos comprimidos. Os resultados foram: 99,23 ± 0,43% para FAM, 100,00 ± 0,32% para PAR, 99,73 ± 0,42% para THI.

A precisão do método foi avaliada em termos de valores de DPR. Os maiores valores de DPR (n=6) não foram mais do que 1,61%.

Os valores de LDD foram 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,1 µg/mL e de LDQ foram 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,5 µg/mL para FAM, PAR e THI respectivamente.

Para o teste de robustez as variações foram: comprimento de onda de detecção ± 2 nm, vazão ± 0,2 mL/min e temperatura do forno ± 2°C. Nos resultados de experimentos realizados, foi verificado que não houve diferença comprovada estatisticamente (teste t, p > 0,05).

Os parâmetros de adequação do sistema foram avaliados de acordo com a USP⁽²²⁾. Os valores DPR da precisão da injeção foram 0,45, 0,45 e 0,40 para FAM, PAR e THI respectivamente. A capacidade dos fatores foram calculadas como 2,14, 2,53 e 4,26 para FAM, PAR e THI respectivamente. Os fatores de cauda foram 1,02, 0,94 e 0,99 e os números de pratos teóricos foram 7779, 10027 e 36328 para FAM, PAR e THI respectivamente. As resoluções entre picos consecutivos foram 3,90 (FAM-PAR), 13,35 (PAR-Padrão) e 11,20 (Padrão-THI).

2.3.2 Perfil verde

Os métodos desenvolvidos foram comparados com os métodos relatados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação entre o método verde desenvolvido e os métodos da literatura.

Analito	Método	Fase móvel	LDD/LDQ (µg/mL)	Aspecto verde
FAM	CLAE desenvolvido	(A) NaH ₂ PO ₄ (pH 4,6; 50 mM), (B) EtOH (95:5, v/v) Vazão: 1,0 mL/min	0,5/1,0	O método desenvolvido é melhor para FAM e PAR. O LDQ é melhor para THI de acordo com o método relatado comprovando boa sensibilidade. A trietilamina também é altamente tóxica.
	CLAE relatado	(A) MeOH e (B) 0,1% trietilamina (TEA) pH 3,0 NaH ₂ PO ₄ (40:60, v/v) Vazão: 1,0 mL/min	4,3/13,1	
PAR	CLAE desenvolvido	(A) NaH ₂ PO ₄ (pH 4,6; 50 mM), (B) EtOH (95:5, v/v) Vazão: 1,0 mL/min	0,1/0,5	O método desenvolvido é ecologicamente correto e o consumo de solvente orgânico (Acetonitrila, MeOH etc.) é menor na preparação da amostra.
	CLAE relatado	(A) ACN (B) H ₂ O (25:75, v/v) ajustado para pH 2,5 com ácido fosfórico. Vazão: 2,0 mL/min	0,1/0,3	
THI	CLAE desenvolvido	(A) NaH ₂ PO ₄ (pH 4,6; 50 mM), (B) EtOH (95:5, v/v) Vazão: 1,0 mL/min	0,1/0,5	A vazão é menor de acordo com os dois métodos relatados. Isso significa menor desperdício, dano e custo.
	CLAE relatado	(A) tampão TFA (pH 2,6) (B) ACN (75:25, v/v) Vazão: 1,5 mL/min	0,2/0,5	

Fonte: DOGAN, et al., 2020.

2.3.3 Análise do artigo

Todos os parâmetros de adequação do sistema foram compatíveis com as preconizadas pela *United States Pharmacopeia* (USP)⁽²²⁾. A validação do método proposto foi alcançada em termos de seletividade, linearidade, exatidão, precisão, repetibilidade e robustez. Os valores de LDD e LDQ foram bastante baixos e menores do que os valores dos métodos relatados.

O perfil verde foi atendido sem perda de qualidade e desempenho cromatográfico.

O objetivo do estudo foi alcançado através das adaptações das condições cromatográficas.

2.4 Artigo 4

O quarto artigo a ser discutido é o “*A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting*”⁽¹¹⁾ que tem como objetivo substituir acetonitrila por etanol na fase móvel de análises do extrato etanólico de *Bidens pilosa* (EEBpil), sem comprometer o desempenho analítico e utilizando os princípios da QAV.

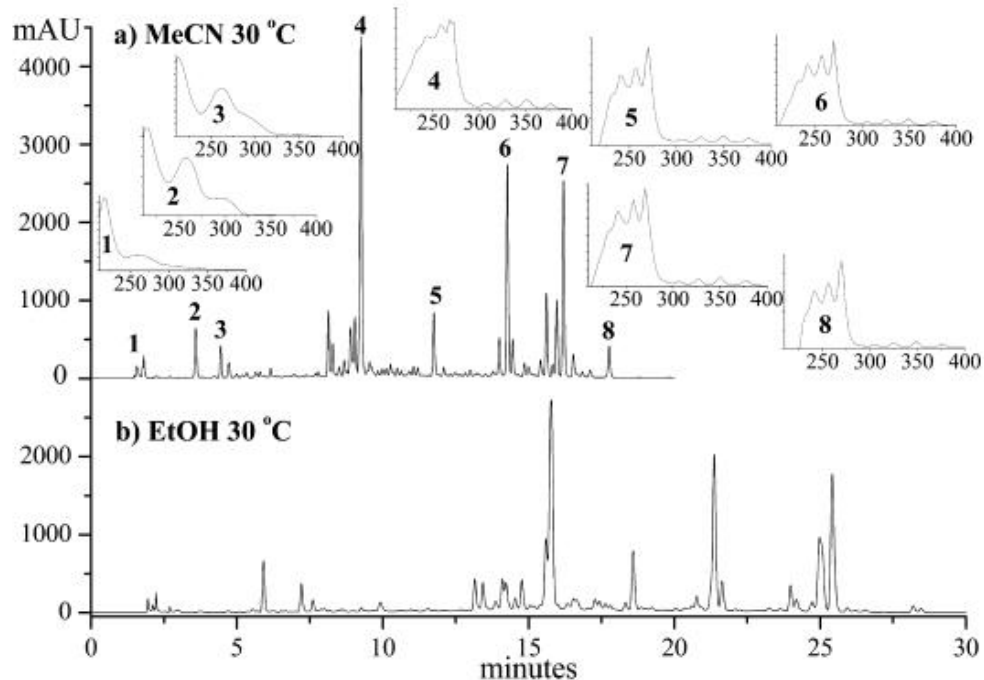
A escolha do etanol como opção de solvente, se deve ao seu perfil verde e suas propriedades físico-químicas vantajosas para CL, exceto pela alta viscosidade, que pode prejudicar o desempenho das análises. A opção utilizada para contornar este problema, foi o aquecimento da solução contendo etanol, pois a temperatura elevada diminui a viscosidade.

Foram desenvolvidos um método de referência utilizando ACN e um método de substituição utilizando EtOH, ambos estatisticamente otimizados. As condições cromatográficas ideais estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 11 - Condições cromatográficas usadas para análise do extrato de planta *Bidens pilosa*.

	Método de referência	Método de substituição
Coluna	C18 (Waters XBridge BEH, 150mm x 4,6mm x 3,5 µm)	
Temperatura	30°C	
Fase Móvel	0,5% AcOH (v/v) e ACN	0,5% AcOH (v/v) e EtOH
Gradiente	8,3-50,4% de ACN 20 min	5-63% de EtOH 30 min
Vazão	1,0 mL/min	0,8 mL/min
Limite operacional UV	254 nm	

Fonte: FUNARI, et al., 2014a.

Figura 12 - Cromatogramas do método de referência e do método de substituição.

Fonte: FUNARI, et al., 2014a.

Cromatogramas CLAE-UV da EBBpil a 254 nm; Coluna: XBridge BEH, 150mm x 4,6mm x 3,5µm. Fase móvel: 0,5% AcOH (v/v) e ACN (a) ou EtOH (b). Gradientes: (a) 8,3-50,4% de ACN em 20 min; e (b) 5-63% de EtOH em 30 min. Vazão: 1,0 mL/min (a) e 0,8 mL/min (b).

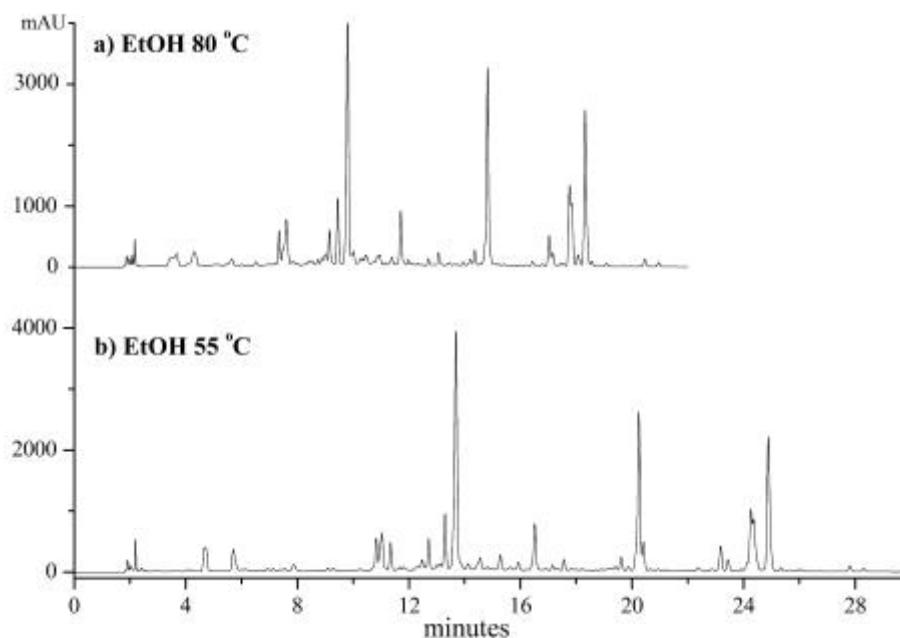
Posteriormente, foi realizada uma investigação a respeito da temperatura, já que esta pode influenciar no desempenho e na seletividade da análise. Estudos estatísticos e projetos fatoriais foram realizados e a condição cromatográfica prevista como ótima, na teoria, não demonstrou o resultado esperado na prática devido a falta de ajuste. A partir deste experimento, foi desenvolvido um método empírico com as condições ideais (5-50,9% de EtOH em 22 min e 80°C). Ambos os métodos estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 12 - Condições cromatográficas usadas para análise da EBBpil. com EtOH como FM e em diferentes temperaturas.

Temperatura	80°C	55°C
Coluna	C18 (Waters XBridge BEH, 150mm x 4,6mm x 3,5 µm)	
Fase móvel	0,5% (v/v) AcOH e EtOH	
Gradiente	5-50,9% de EtOH 22 min	5-55% de EtOH 30 min
Vazão	0,8 mL/min	
Detector UV	254 nm	

Fonte: FUNARI, et al., 2014a.

Figura 13 - Cromatogramas das análises de EBBpil. com EtOH em diferentes temperaturas.



Fonte: FUNARI, et al., 2014a.

Analisando os cromatogramas da Figura 12 e da Figura 13, é possível observar que o aumento da temperatura desempenhou um papel positivo na análise, aumentando a eficiência da separação. O número médio de picos por minuto para o método com EtOH a 30°C foi de $2,87 \pm 0,06$, para o método com EtOH a 80°C foi de $4,11 \pm 0,09$ e para o método com ACN a 30°C foi de $4,28 \pm 0,02$, ligeiramente maior do que o método EtOH a 80°C.

Para poder medir e comparar os métodos desenvolvidos, foram utilizadas as métricas GCFR e HPLC-EAT, já citadas anteriormente, acrescentadas a Demanda Cumulativa de Energia (DCE) e ao consumo CLAE. O DCE calcula a energia utilizada durante a produção do solvente menos a energia recuperada durante o tratamento do

mesmo. Já o consumo CLAE calcula a energia utilizada pelo sistema para realizar a análise.

A junção desses valores, resulta em uma métrica final chamada *Comprehensive Metric to Compare Liquid Chromatography Methods* (CM), representada pela Equação 2.

$$CM = \frac{GCFR}{HPLC - EAT \times E_{S+S}} \quad (2)$$

Sendo E_{S+S} a energia consumida pelo sistema CLAE mais o DCE. Um valor de CM superior, indica um melhor método abrangendo todas as métricas apresentadas. Segue na Tabela 13, os valores obtidos para os métodos desenvolvidos.

Tabela 13 - Comparação dos desempenhos dos métodos desenvolvidos com ACN a 30°C (1) e com EtOH a 30°C (2) e 80°C (3).

Método	GCFR	HPLC-EAT	Consumo CLAE (kwh)	CED ^a (kwh)	HPLC-EAT x E_{S+S}	CM
1	27,803	29,1	0,18	$0,30 \times 10^{-4}$	5,24	5307,1
2	17,055	18,9	0,25	$1,12 \times 10^{-4}$	4,72	3607,9
3	26,471	12,4	0,37	$0,73 \times 10^{-4}$	4,59	5763,8

Fonte: FUNARI, et al., 2014a.

a) os valores de DCE são baseados nos apresentados por Capello et al. recalculado para 6,40, 7,42 e 4,87g de solvente orgânico consumido por corrida com os métodos 1, 2 e 3, respectivamente.

De acordo com a Tabela 13, o maior valor de CM foi alcançado pelo método com EtOH a 80°C, seguido pelo método com ACN a 30°C e por último o método com EtOH a 30°C. Os dois primeiros métodos demonstraram boa separação, com valores muito próximos, porém, o método utilizando EtOH a 80°C obteve um valor líquido superior devido ao seu perfil mais verde.

2.4.1 Análise do artigo

Para contornar a alta viscosidade do etanol, foi realizado um método com temperatura elevada. O uso da alta temperatura não só diminuiu a viscosidade do solvente, mas também demonstrou ser capaz de aumentar a seletividade e eficiência das análises. O aumento da temperatura também permitiu uma redução na quantidade de solvente utilizado, devido ao aumento da força eluotrópica da água na FM, atingindo mais um princípio da QAV.

Durante todo o trabalho, foram abordados 7 dos 12 princípios da QAV, distribuídos entre a fase de tratamento da amostra, a fase de desenvolvimento dos métodos e durante o processo de análise.

A substituição da acetonitrila por etanol somada a uma temperatura adequada, mostrou um bom desempenho na análise realizada. De acordo com os resultados, o método com EtOH a 80°C foi melhor do que o método de referência com ACN a 30°C.

2.5 Artigo 5

O quinto artigo a ser discutido é o “*Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener*”⁽²⁴⁾ que tem como objetivo testar solventes orgânicos alternativo, mais ecológicos do que metanol, acetonitrila e THF na CLAE preparativa.

A escolha dos solventes alternativos foi feita através da lista da Pfizer de solventes preferidos (em relação ao perfil verde), do triângulo de Snyder (em relação ao grupo de seletividade) e das propriedades físico-químicas. Os solventes escolhidos para substituir MeOH, ACN e THF foram EtOH, acetona e acetato de etila.

Para avaliar os solventes, foi utilizado um grupo de trilactonas terpênicas (TTLs), são elas ginkgolídeo A (GA), B (GB), C (GC), J (GJ) e bilobalídeo (BB). A mistura ternária utilizada como método de referência para separação de TTLs foi metanol-THF-água (20:10:70), em uma coluna UHPLC 100mm, com $R_{s_{min}}$ de 3,13 e tempo total de execução no modo isocrático inferior a 10 min.

Para a otimização do processo, foram necessárias duas etapas, primeiro a utilização de um design simplex, que encontra duas composições de solventes com boa separação dos analitos e, posteriormente, as condições são convertidas do modo isocrático para gradiente para que o software de simulação CLAE calcule, dentre vários cromatogramas atribuídos, um gradiente ideal.

Na primeira etapa, várias proporções de água-modificador orgânico foram testadas isocraticamente para determinar 15 composições com fatores de retenção médio (k') próximos ao do método de referência. Essas composições estão distribuídas em um triângulo de sistema ternário, onde as composições que possuem as melhores resoluções mínimas (~ 4) estão posicionadas em uma linha reta. Com isso, foi deduzido que a composição ideal estava próximo a essa linha e, portanto, foram selecionadas as composições dos extremos da reta para a próxima etapa,

água-etanol-acetato de etila (83: 9,5: 7,5) e água-acetona-acetato de etila (76: 20,25: 3,75).

Na segunda etapa, as condições isocráticas foram convertidas em condições gradiente para executar o software de simulação CLAE. Após algumas corridas, foi estabelecida uma eluição de 6 min em gradiente 5% a 80% B para acetona-acetato de etila-água e uma eluição de 6 min em gradiente de 5% a 70% B para etanol-acetato de etila-água. Para uniformizar e tornar os métodos reproduzíveis, ambos foram executados de 6% a 100% B.

Tabela 14 - Conversão das condições isocráticas para gradiente e três composições de fase móvel finais para usar no software.

		B1	50% B2 em B1	B2
Isocrático	Fase móvel	Acetona-acetato de etila-água	-	Etanol-acetato de etila-água
	Razão	20,25: 3,75: 76	-	9,5: 7,5: 83
Gradiente	Fase móvel A	Água		
	Composição	100%		
	Fase móvel B	Acetona-acetato de etila-água	Acetona-etanol- acetato de etila-água	Etanol-acetato de etila-água
	Composição	67,5: 12,5: 20	33,75: 19,55: 21,7: 25	39,1: 30,9: 30

Fonte: SHEN, et al., 2015.

As três composições finais de fase móvel mostradas na Tabela 14, foram utilizadas em corridas de 6 min e 8 min e em 25°C e 50°C, gerando 12 cromatogramas experimentais. A partir destes cromatogramas, o software calculou o gradiente ideal para a separação dos 5 TTLs. O gradiente ideal encontrado foi 22% B2 em B1 usado como fase móvel B (correspondente com água-acetona-EtOH-acetato de etila (22,2: 52,65: 8,6: 16,55), temperatura de 22,5°C e gradiente linear de 1% a 38,56% em 12,28 min). Nessas condições, a Rsmin prevista foi de 4,8 (para GC e BB). Mantendo a composição da FM e a temperatura da coluna, o software obteve uma maior otimização de gradiente, com Rsmin de 5,14 (para GJ e GC) e gradiente de 10,46 min. Este último, foi selecionado como a melhor condição para a verificação experimental.

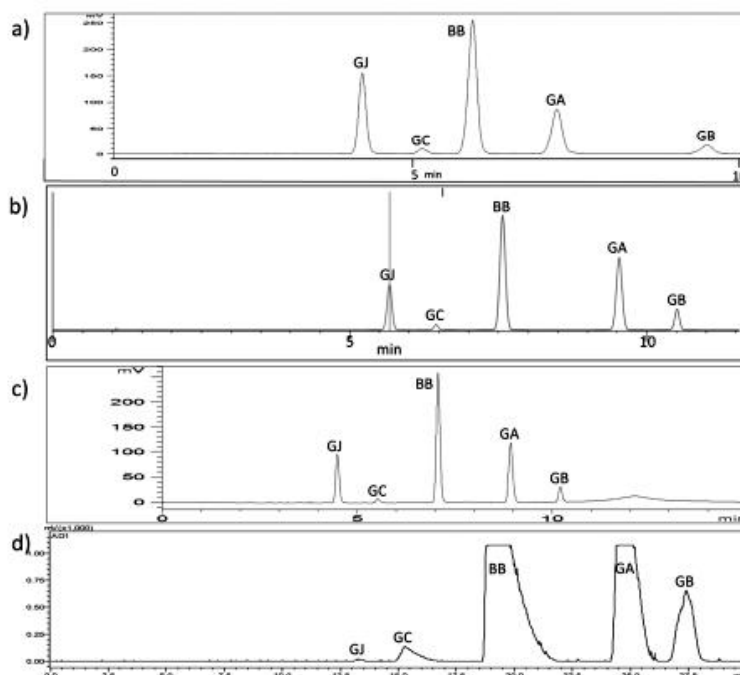
Tabela 15 - Melhores condições de gradiente e escalonamento de UHPLC via CLAE para CLAE preparativa.

UHPLC		CLAE analítica		CLAE preparativa	
Tempo (min)	B%	Tempo (min)	B%	Tempo (min)	B%
0	21	0	21	0	21
3,72	21	11,5	21	12,25	21
4,86	30	11,66	30	12,38	30
7,37	30	17,68	30	18,78	30
10,46	59	25,09	59	26,65	59
15	21	35,99	21	30	21

Fonte: SHEN, et al., 2015.

À partir da otimização, foi realizado o experimento com o gradiente e as condições selecionadas, possibilitando a comparação dos cromatogramas. Para a CLAE preparativa, as condições foram ampliadas através de cálculos para a coluna CLAE preparativa (250 x 22mm).

Figura 14 - Comparação dos cromatogramas do método de referência, simulado, experimental e CLAE preparativa.



Fonte: SHEN, et al., 2015.

a) Cromatograma de referência de 5 TLLs com metanol-THF-água (2:1:7) como FM; b) cromatograma simulado para FM ideal do UHPLC; c) cromatograma experimental para FM ideal do UHPLC; cromatogramas a e c obtidos em uma coluna C18 100 x 2,1mm a 0,20 mL/min; d) cromatograma de pHPLC para FM ideal em uma coluna C18 250 x 22mm, 480 mg injetado.

Comparando os cromatogramas simulado e experimental, não coincidiram perfeitamente, mas a resolução e o perfil dos picos foram coerentes. A resolução mínima determinada experimentalmente superou a resolução simulada, 5,76 e 5,14 respectivamente, e ambas foram muito superiores ao método de referência, 3,13. Os tempos de análise foram similares, em torno de 10 min. A análise CLAE preparativa preservou a linha base da separação.

2.5.1 Análise do artigo

A substituição dos solventes tóxicos por etanol, acetona e acetato de etila demonstrou um bom resultado. A resolução mínima alcançada (5,76) foi bem superior à de referência (3,13), demonstrando ser mais eficiente. A ampliação do método para CLAE preparativa foi realizada com sucesso, a seletividade não foi afetada e a linha base de separação foi mantida.

3 CONCLUSÃO

O etanol foi considerado, por todos os artigos revisados, uma ótima opção de solvente alternativo, devido ao seu perfil verde e suas propriedades físico-químicas. Para contornar a alta viscosidade do etanol, alguns estudos reduziram a vazão e outros elevaram a temperatura da análise, ambos os métodos funcionaram muito bem.

A substituição de solventes tóxicos por etanol é facilmente aplicável, pois além das opções que exigem adaptação da instrumentação, a substituição pode ser feita apenas ajustando as condições cromatográficas de um sistema CLAE convencional.

A utilização do etanol na fase móvel, comprovou ser possível tornar os métodos mais ecológicos, mais econômicos e até mesmo mais eficientes do que os métodos de referência.

Muitas estratégias podem ser aplicadas separadamente ou em conjunto para tornar um método mais ecológico, além da substituição de solventes.

REFERÊNCIAS

- 1 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2002.
- 2 DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, mai. 1998. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/>>. Acesso em: 16 out. 2020.
- 3 DCTECH. **[Bomba HPLC]**. 2017. il. Disponível em: <<https://www.dctech.com.br/problemas-na-bomba-no-injetor-ou-no-detector-hplc-como-identifica-los-e-resolve-los/>>. Acesso em: 28 set. 2020.
- 4 MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n.7, p. 1559-1568, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000700024&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 5 out. 2020. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700024.
- 5 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/d7e1/7200f089605fd1ab0f9955deb8e2dc293419.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- 6 WELCH, C. J., et al. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends Anal. Chem.** v. 29, p. 667–680, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993610000907>>. Acesso em: 30 set. 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2010.03.008.
- 7 LENARDAO, E. J., et al. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000100020&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 out. 2020. DOI: 10.1590/S0100-40422003000100020.
- 8 YABRÉ, M., et al. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. **Molecules**, 23, n. 5, p. 1065, mai. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1065>>. Acesso em: 21 set. 2020. DOI: 10.3390/molecules23051065.
- 9 OLIVEIRA, B. F. **Química Analítica Verde: Contribuições para a agenda Ambiental PUC-Rio**. Dissertação (Mestrado em Metrologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 110. 2012. Disponível em: <<https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/>>. Acesso em: 05 out. 2020.
- 10 GALUSKA, A., et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends Anal. Chem.** Poland, v. 37, p. 61-72, jul-ago. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993612001525>>. Acesso em: 5 out. 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2012.03.013.

- 11 FUNARI, C. S., et al. A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprint. **Journal of Chromatography A**, 1354, p. 34-42, ago. 2014a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314007547>>. Acesso em: 30 set. 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.018.
- 12 PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chem.**, 16, p. 4546-4551, jul. 2014. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/c4gc01149j>>. Acesso em: 16 out. 2020. DOI: 10.1039/C4GC01149J.
- 13 HAYNES, W. M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 97 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2016.
- 14 OLIVEIRA, M. Entre açúcares e genes: Aplicação do conhecimento científico da cana deverá servir ao desenvolvimento de novas ferramentas para a produção de etanol. ed. 200, São Paulo, SP: Pesquisa FAPESP, out. 2012. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/entre-acucares-e-genes/>>. Acesso em: 24 jan. 2021.
- 15 NOVA CANA. **Processos de fabricação do etanol**. Curitiba, c2013. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao>>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 16 BARROS, T. D. Agroenergia: Etanol. **Embrapa**, Campinas, SP, s/d. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj2smqjw02wyiv802hvm3jah4zizi.html>>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- 17 FUNARI, C. S., et al. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **J. Sep. Sci.** v. 37, p. 37-44, jan. 2014b. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.201300955>>. Acesso em: 16 out. 2020. DOI: 10.1002/jssc.201300955.
- 18 JI, Y. B., et al. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1066, p. 97-104, fev. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305001007>>. Acesso em: 16 out. 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.01.035.
- 19 ELZANFALY, E. S., et al. Validated green high-performance liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: A comparison with reported conventional methods. **J. Sep. Sci.** v. 38, p. 757-763, mar. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.201401151>>. Acesso em: 04 jan. 2021. DOI: 10.1002/jssc.201401151.
- 20 NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). **[Estruturas químicas]**. 2004. il. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 03 fev. 2021.

- 21 ICH, ICOHORFROPFHU et al. Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. In: **International Conference on Harmonization**, Geneva. 2005.
- 22 THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP-24, NF-19, Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p. 2149-2151.
- 23 DOGAN, A.; EYLEM, C. C.; AKDUMAN, N. E. B. Application of green methodology to pharmaceutical analysis using eco-friendly ethanol-water mobile phases. **Microchemical Journal**. v. 157, n. 104895, set. 2020. Disponível em : <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X20301119>>. Acesso em: 07 jan. 2021. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104895.
- 24 SHEN, Y.; CHEN, B.; BEEK, T. A. V. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green Chemistry**. v. 7, p. 4073-4081, jun. 2015. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/c5gc00887e>>. Acesso em: 03 fev. 2021.