

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ECO FRIENDLY /
VERDES**

Rodrigo Fernandez Perez

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientador: Dr. Paulo Victor Cuesta Calvo

São Paulo
2023

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As estratégias de Química Analítica verde no quadro dos Princípios da Química Verde.....	10
Figura 2 - Os objetivos da química analítica verde no âmbito dos parâmetros analíticos.	11
Figura 3 - Pictograma de avaliação do verde.	12
Figura 4 - Compartimentos de um HPLC.....	14
Figura 5 - Modelos de cromatograma mostrando vários picos e seus tempos de retenção.....	15
Figura 6 - Redução do consumo de solventes em função do diâmetro da coluna. Separação de seis impurezas do processo de um intermediário fármaco-substância utilizando na condição (a) uma coluna C18,100 x 4.6m, 2.7µm e em (b) uma coluna C18,100 x 3.0mm, 2.7µm, ambas a uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min.	20
Figura 7 - Comparação entre (A) HPLC e (B) UHPLC.....	21
Figura 8 - Avaliação da contrapressão em coluna monolítica versus colunas particuladas a diferentes taxas de fluxo (A) . Estrutura interna das colunas monolíticas (B)	23
Figura 9 - Separação de cinco B-bloqueadores utilizando uma coluna de sílica monolítica a diferentes taxas de fluxo.	23
Figura 10 - Separação da Rifampicina e das suas quatro impurezas em uma coluna monolítica (A) e em uma coluna convencional (B)	24
Figura 11 - Nove cromatogramas obtidos usando coluna Onyx Monolithic C18 (100x4,6mm) e tampão/etanol como fase móvel.	25
Figura 12 - Estrutura interna da partícula Core-Shell (A) . Comparação do caminho da fase móvel em coluna convencional versus coluna com partícula Core-Shell (B)	27
Figura 13 - Cromatogramas ilustrando a separação isocrática de drogas citotóxicas em duas colunas C-18 com tamanho e partículas diferentes.	28
Figura 14 - Separações comparativas com partículas de 5 µm: <i>Fused-Core</i> vs. totalmente poroso.	28
Figura 15 - Cromatogramas obtidos por HPLC na análise das misturas CB/CD, PB/PZ.	30

Figura 16 - Cromatogramas obtidos com uso da coluna C18 para separação dos componentes básicos.....	32
Figura 17 - Comparação das propriedades físicas entre ACN, MeOH e EtOH.....	33
Figura 18 - Separação por RP-HPLC utilizando três modificadores orgânicos diferentes.....	34
Figura 19 - Método farmacopeico na condição 1.....	36
Figura 20 - Método na condição 2.	36
Figura 21 - Método na condição 3.	37
Figura 22 - (A) Controle da polaridade do eluente (constante dielétrica) alterando a temperatura da água. (B) Controle da tensão superficial do solvente alterando a temperatura.	39
Figura 23 - Separação de 5-fluorouracil(5-FU), metotrexato (MTX), 7-hidroximetotrexato (7-OH-MTX) e etoposido (VP-16) usando água superaquecida. (A) condição em 80 °C e (B) em 150 °C.	40
Figura 24 - Comparação da polaridade da fase móvel constituída de CO ₂ com solventes orgânicos em relação a polaridade de diferentes fases estacionárias.	41
Figura 25 - (A) Comparação do desempenho da análise por SFC e RP-HPLC. (B) Análise ultrarrápida de esteroides em condições SFC e UHPLC.	42
Figura 26 - Cromatograma de paracetamol, cafeína e aspirina (ácido acetilsalicílico) utilizando 10% v / v de fase móvel de lactato de etila a 270 nm.....	44
Figura 27 - (A) Comparação de cromatogramas para a separação de acetaminofeno e cafeína usando fase móvel fresca (azul) e fase móvel reciclada através da coluna com carvão (vermelha) e fase móvel reutilizada (verde). (B) Sistema de HPLC de bomba única mostrando a análise usando fase móvel fresca (caminho azul), fase móvel reciclada por meio de uma coluna cheia de carvão (caminho verde) e fase móvel reutilizada sem limpeza (caminho vermelho).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de fase estacionária.	16
Tabela 2 - Fases móveis comumente usadas em RP-HPLC.	17
Tabela 3 - Toxicidade dos solventes orgânicos.	18
Tabela 4 - Consumo de solvente em função das dimensões da coluna de HPLC.	19
Tabela 5 - Condição cromatográfica entre HPLC e UHPLC.	22
Tabela 6 - Os pontos de penalidade para a determinação do método HPLC proposto.	26
Tabela 7 - Parâmetros de adequação do sistema dos métodos propostos.	30
Tabela 8 - Comparação entre método proposto e o convencional.	31
Tabela 9 - Composição e condições otimizadas para todas as fases móveis.	32
Tabela 10 - Análises farmacêuticas em RP-HPLC usando fases móveis à base de etanol.	35
Tabela 11 - Comparação das condições cromatográficas em DAD-237 nm.	37
Tabela 12 - Aplicações de HTLC em análises farmacêuticas.	38
Tabela 13 - Demonstração de altas velocidades com baixa pressão em SFC.	43

LISTA DE ABREVIATÖES

ACN	Acetonitrila
AAS	Ácido acetilsalicílico
CO ₂	Dióxido de carbono
DAD	Detector de arranjo de Diodos
EtOH	Etanol
FM	Fase móvel
g	grama
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
HTLC	Cromatografia líquida de alta temperatura
H ₂ O	Água
LC	Cromatografia Líquida
MeOH	Metanol
NEMI	Índice Nacional de Métodos Ambientais
RPHPLC	Cromatografia Líquida de fase reversa
SFC	Fluido supercrítico
SHW	Cromatografia com água superaquecida
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UHPSFC	Cromatografia de fluido supercrítico de ultra-alta performance
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
4. QUÍMICA VERDE	9
4.1. ANÁLISE DO VERDE	12
5. IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS <i>ECO FRIENDLY</i>	13
5.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC	14
5.2 TOXICIDADE DOS SOLVENTES ORGÂNICOS EM RP-HPLC	17
6. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES.....	18
6.1. REDUÇÃO DE SOLVENTES	18
6.1.1. Efeito do diâmetro da coluna no consumo da fase móvel.....	19
6.1.2 Separação rápida usando UHPLC	20
6.2. SUBSTITUIÇÃO DE SOLVENTES	29
6.2.1. Substituição de acetonitrila por etanol em RP-HPLC.....	29
6.2.2. Cromatografia líquida de alta temperatura - HTLC	35
6.2.3. Substituição de solvente por fase 100% aquosa.....	38
6.2.4 Substituição de solvente por CO ₂	40
6.2.5. Substituição por outros solventes orgânicos	43
7. ABORDAGEM ECOLÓGICA: RECICLAGEM DE SOLVENTES	44
8. CONCLUSÃO	47
9. REFERÊNCIAS	48

RESUMO

Rodrigo F. P. **Desenvolvimento de métodos analíticos mais eco friendly / verdes** 2023. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: Química analítica verde; cromatografia verde; Técnicas de química verde; Métodos analíticos verdes

Nas últimas décadas, tem ganho cada vez mais atenção da química analítica verde o desenvolvimento de metodologias analíticas *eco friendly*, que visam reduzir os impactos ambientais através da eliminação ou diminuição da quantidade de solventes orgânicos tóxicos utilizados em análises. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) é a técnica analítica mais utilizada na área farmacêutica para quantificação de substâncias químicas. No entanto, a RP-HPLC geralmente consome grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, como acetonitrila e metanol, diariamente e conseqüentemente geram grandes quantidades de resíduos. O objetivo deste trabalho foi revisar, na literatura, as estratégias utilizadas pela comunidade analítica para substituir métodos analíticos convencionais por outros mais ecológicos com os mesmos parâmetros analíticos. As tendências recentes no desenvolvimento de métodos analíticos *eco friendly* concentram-se na substituição da acetonitrila por solventes mais verdes, como por exemplo, o etanol, na implantação de tecnologias modernas de fase estacionária para diminuição do tempo de análise e na utilização de tecnologias mais especializadas como UHPLC, SFC e HTLC para diminuição do consumo de solventes orgânicos. Os métodos analíticos desenvolvidos com as estratégias ecológicas provaram ser mais verdes do que os métodos convencionais, onde o tempo de análise e a quantidade de consumo de solventes orgânicos tóxicos diminuíram.

ABSTRACT

In recent decades, the development of greener analytical methodologies that aim to reduce environmental impacts by eliminating or reducing the amount of organic solvents used in analysis have gained increasing attention in the area of green analytical chemistry. Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is the most widely used analytical technique in pharmaceuticals for quantification of chemicals. However, RP-HPLC generally consumes large quantities of toxic organic solvents, such as acetonitrile and methanol, on a daily basis and consequently generates large amounts of residue. The objective of this work was to review the strategies used by the analytical community to replace conventional analytical methods with more environmentally friendly ones with the same analytical parameters. Recent trends in the development of green analytical methods focus on the replacement of acetonitrile by greener solvents such as ethanol, the implementation of modern stationary phase technologies to decrease the analysis time and the use of more specialized technologies such as UHPLC, SFC and HTLC to decrease the consumption of organic solvents. The analytical methods developed with the eco-friendly strategies have proven to be greener than conventional methods, where the analysis time and the amount of consumption of toxic organic solvents have decreased.

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é descrita como uma técnica analítica de separação robusta com alta seletividade e amplamente utilizada em vários segmentos, principalmente em análises farmacêuticas para quantificação de ativos farmacêuticos, caracterização de impurezas e produtos de degradação. A maioria dos métodos de HPLC desenvolvidos na área farmacêutica são baseados no modo de fase reversa (RP-HPLC) usando uma fase estacionária hidrofóbica e uma fase móvel polar (NIKOLIN et al., 2004).

Os métodos convencionais de RP-HPLC geralmente utilizam como solvente orgânico, na fase móvel, acetonitrila (ACN) e metanol (MeoH) misturados com água. ACN e MeoH são considerados ótimos solventes orgânicos em cromatografia, devido ao baixo comprimento de onda no UV (190 nm e 205 nm para ACN e MeoH, respectivamente), ótima miscibilidade com a água e baixa viscosidade (WELCH et al., 2010). No entanto, apresentam graves problemas em termos ambientais e de segurança à saúde por serem altamente tóxicos com grande geração de resíduos contaminados (PENA-PEREIRA; KLOSKOWSKI; NAMIEŚNIK, 2015).

O impacto ecológico do uso de grandes quantidades de solventes e a geração de resíduos em métodos tradicionais de RP-HPLC motivou a comunidade científica a buscar por alternativas para a substituição de metodologias analíticas poluentes por métodos mais sustentáveis. Pesquisadores em todo o mundo estão adotando rapidamente a química analítica verde para o esverdeamento dos métodos analíticos (ASSASSI et al., 2015).

O desenvolvimento de novos métodos analíticos mais ecológicos baseados na química analítica verde se concentram na redução do consumo de solventes tóxicos nas análises químicas devido à dificuldade de eliminar totalmente o uso de solventes sem que haja perda de resolução. As estratégias mais utilizadas para o esverdeamento das análises de HPLC focam na diminuição do comprimento da coluna, diâmetro interno e/ou partícula da coluna, substituição de solventes tóxicos e perigosos por alternativas mais verdes.

Esta revisão focou em apresentar os avanços recentes em métodos de RP-HPLC verdes e expor estudos que comprovam a viabilidade da substituição de ACN e MeOH por solventes verdes sem impactar parâmetros analíticos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo realizar a revisão bibliografia de métodos analíticos *eco friendly*, de modo a contextualizar a importância de métodos analíticos mais verdes, descrever as estratégias para o desenvolvimento de métodos *eco friendly* e demonstrar a viabilidade de esverdear métodos convencionais que utilizam solventes tóxicos sem que haja perda de eficiência.

3. METODOLOGIA DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente trabalho foi desenvolvido a partir da busca ativa e leitura de materiais científicos, como artigos, revisões de literatura, teses e monografias. O levantamento bibliográfico do tema foi feito utilizando as bases de dados: SciELO, *Science Direct*, *PubMed* e *Web of Science*.

Os termos utilizados na busca foram: “*green analytical chemistry*”, “*fast chromatography*”, “*liquid chromatography more eco-friendly*”, “*sustainable and eco-friendly alternatives HPLC*”. Após a avaliação do título e resumo desses materiais, foram selecionadas publicações datadas nos idiomas inglês e português.

4. QUÍMICA VERDE

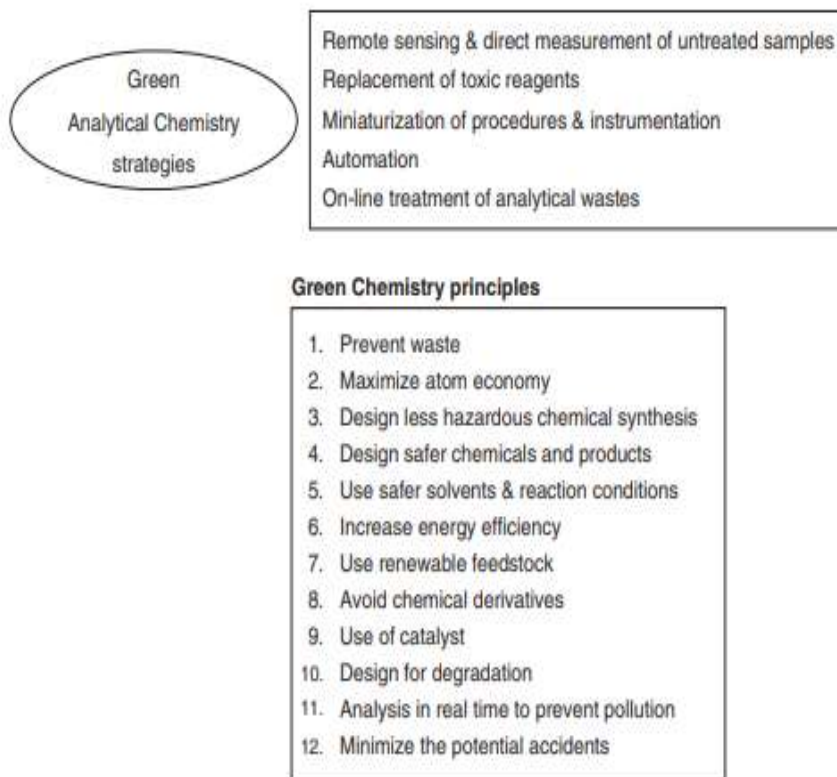
A Química Verde surgiu na década de 1990 como uma maneira de que as habilidades, conhecimentos e talentos na área da química pudessem ser usados para evitar ameaças à saúde e ao meio ambiente em todos os tipos de processos químicos (ANASTAS, P.; EGHBALI, N., 2010).

Nas últimas décadas, a comunidade química tem focado na continuidade do desenvolvimento, porém, de maneira menos danosa ao meio ambiente, se mobilizando para desenvolver novos produtos químicos menos perigosos (PRADO, 2003). Esse novo cenário apresentado pela química é conhecido como Química Sustentável ou Química Verde, que envolve, de acordo com Tunto et al. (2000), a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias tóxicas.

A ideia de substituir substâncias perigosas por substâncias menos poluentes juntamente com o uso consciente das matérias-primas e energia podem ser resumidas em 12 princípios básicos (Figura1), os quais focam mais a prevenção do que a remediação da poluição e fornecem diretrizes para melhorar os métodos de

síntese através da utilização de substâncias químicas renováveis as matérias-primas (LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012).

Figura 1 - As estratégias de Química Analítica verde no quadro dos Princípios da Química Verde.

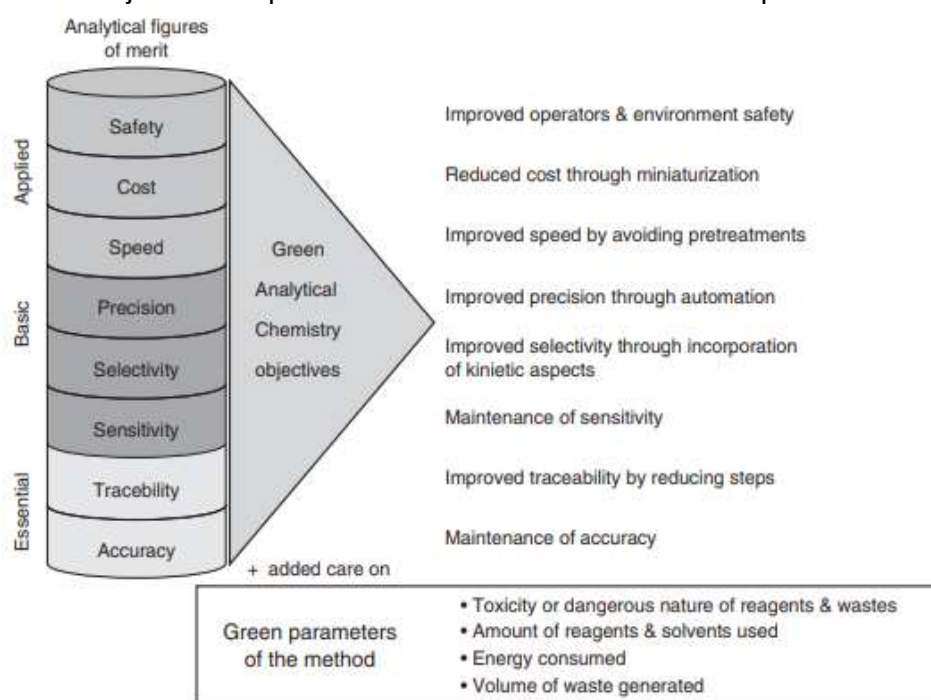


Fonte: LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012.

Em 1999, a química analítica verde (*Green Analytical Chemistry*) foi proposta devido à necessidade de desenvolver metodologias analíticas mais sustentáveis ao meio ambiente.

A Química Analítica Verde surge com objetivo de diminuir ou eliminar a produção de resíduos tóxicos na análise química sem prejudicar o desempenho analítico (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008), como representado na Figura 2, em que os parâmetros analíticos são mantidos. Nesse contexto são desenvolvidas estratégias analíticas visando à diminuição do consumo de reagentes e/ou solventes tóxicos, assim como a diminuição de resíduos. Alternativa de técnicas analíticas mais sustentáveis também é uma estratégia que vem sendo explorada pela comunidade química.

Figura 2 - Os objetivos da química analítica verde no âmbito dos parâmetros analíticos.



Fonte: LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012.

O desenvolvimento de métodos analíticos verdes é uma vertente que tem se destacado cada vez mais na área da Química analítica. No entanto, a aplicação das métricas tradicionais de química verde, os 12 princípios fundamentais (Figura 1), não se enquadram adequadamente na química analítica verde. Os parâmetros mais populares, por exemplo: *Atom Economy*, *Reaction Mass Efficiency* e *Eco-Scale* foram introduzidos para fins de síntese orgânica e não para área analítica, uma vez que geralmente essas abordagens requerem conhecimento do número de moléculas do analito que dá um sinal analítico mensurável, o que nem sempre é possível obter. (KORANY et al., 2017).

A avaliação de metodologias analíticas no contexto da química verde apresenta grande dificuldade devido ao grande número e diversidade de analitos e métodos analíticos, solventes, a complexidade das matrizes de amostra e os critérios analíticos que precisam ser considerados. Outra dificuldade da metodologia analítica verde é a característica de várias etapas do processo analítico. Várias ferramentas de avaliação foram recentemente introduzidas para a avaliação do caráter verde dos métodos analíticos como alternativa às métricas tradicionais de química verde dos 12 princípios (GAŁUSZKA et al., 2012).

4.1. ANÁLISE DO VERDE

Uma das ferramentas mais abrangentes para avaliar o “verde” dos métodos analíticos é um banco de dados pesquisa gratuito na Internet, denominado de Índice Nacional de Métodos Ambientais (NEMI) o qual fornece um pictograma que classifica os métodos analíticos de acordo com quadro critérios PBT (persistente, bioacumulativo e tóxico), corrosivo ($\text{pH} < 2$ ou > 12) perigoso e resíduos (quantidade de resíduo gerado > 50 g) (GAŁUSZKA et al., 2012).

A Figura 3 ilustra o pictograma que foi desenvolvido para visualização do perfil de um determinado método analítico considerado verde, ao atender os referidos critérios.

Figura 3 - Pictograma de avaliação do verde.



Fonte: GAŁUSZKA et al., 2012.

Apesar da simplicidade da ferramenta NEMI, ela é mais qualitativa e menos eficaz em fornecer informações sobre o método analítico de acordo com Galuszka et al. (2012), pois, 14 dos 16 métodos analisados tinham o mesmo pictograma.

Uma das métricas verdes comumente usadas é a escala ecológica analítica, que é uma ferramenta de avaliação semiquantitativa para estimar o verde de um determinado método analítico. São atribuídos pontos de penalidade para parâmetros do método analíticos não considerados ideias ecologicamente, os quais estão relacionados com a natureza do regente, consumo de energia, periculosidade de reagentes e solventes, resíduos gerados. (MOHAMED et al., 2016).

O método analítico verde ideal tem pontuação total de 100. Se a pontuação total exceder 75, o método é considerado como excelente, se for superior a 50 o método é aceitável. No entanto, se a pontuação total estiver abaixo de 50 o método

analítico é expresso como um método analítico verde inadequado (GAŁUSZKA et al., 2012).

5. IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS *ECO FRIENDLY*

A quantificação e a separação de substâncias químicas geralmente envolvem duas técnicas cromatográficas mais conhecidas: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*). Ambas as cromatografias são as mais utilizadas na área da química analítica devido aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos com as técnicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; ARMENTA; LA-GUARDIA, 2010).

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é geralmente considerada menos verde do que a cromatografia gasosa, uma vez que requer solventes orgânicos para a separação e geram grandes quantidades de resíduos a serem descartados (LESELLIER, WEST, 2015).

A maioria dos solventes orgânicos utilizados como fase móvel são acetonitrila e metanol, os quais são tóxicos para o meio ambiente e a saúde humana. Apesar do metanol ser menos tóxico e mais facilmente biodegradável do que a acetonitrila, é também classificado como solvente perigoso devido à sua toxicidade inerente e às grandes exigências da sua eliminação de resíduos. A quantidade de resíduos gerada pelas análises de HPLC não podem ser negligenciadas. De fato, um sistema de HPLC em funcionamento contínuo equipado com uma coluna convencional (15-25 cm de comprimento, 4,6 mm i.d., embalado com 5 µm de partículas) a uma taxa de fluxo 1–1,5 mL/min de fase móvel produz cerca de 1,5 L de resíduos por dia, o que significa cerca de 500 L de efluentes por ano. Este volume fica ainda bem maior em grandes empresas farmacêuticas que utilizam centenas de HPLC na sua investigação, desenvolvimento e em laboratórios de controle de qualidade, resultando em milhares de litros de resíduos tóxicos produzidos todos os dias (WELCH et al., 2010).

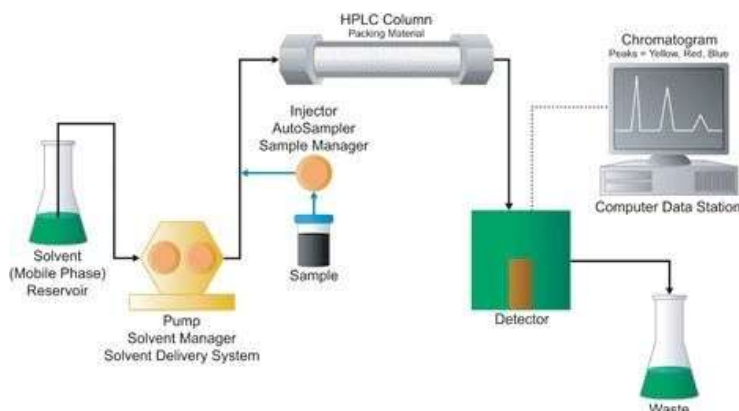
5.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia líquida de alta pressão é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas para quantificação e qualificação de substâncias químicas não voláteis ou termicamente instáveis presente em uma mistura (SNYDER et al, 2009).

O termo cromatografia líquida de alta eficiência deve-se ao desenvolvimento de um sistema capaz de trabalhar em altas pressões, o que possibilitou corridas rápidas com picos cromatográficos de maior resolução. O HPLC por ser um método robusto com alta capacidade de separação analítica tornou-se o método de escolha na indústria farmacêutica como a principal ferramenta analítica aplicada em todas as fases do medicamento: descoberta, desenvolvimento e produção (SNYDER et al, 2009).

Um sistema básico de HPLC inclui uma coluna cromatográfica preenchida com uma fase estacionária, também consiste em um sistema de bombeamento de alta pressão para passar uma fase móvel pressurizada através da coluna, de um injetor, frequentemente incluído em um amostrador automático e de um ou mais detectores. Uma ilustração simples de construção para um HPLC é mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Compartimentos de um HPLC.

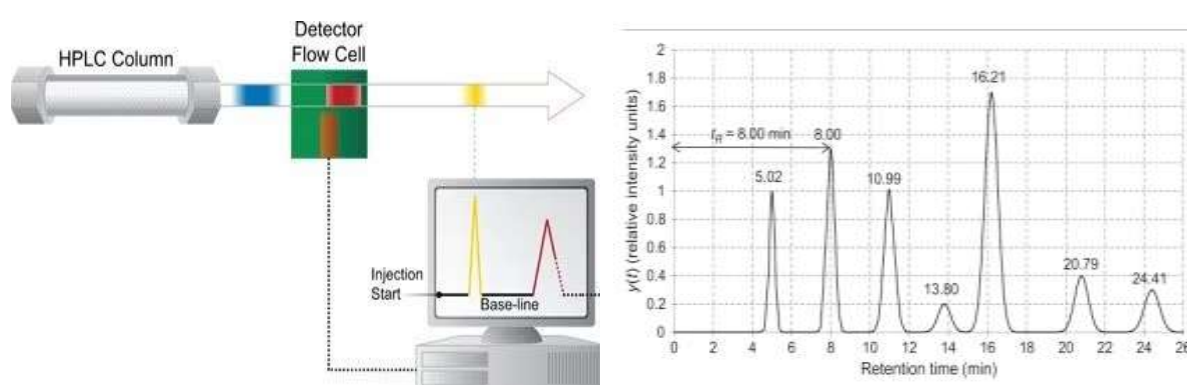


Fonte: SNYDER et al., 2009.

Depois das substâncias serem separadas na coluna cromatográfica, a fase móvel passa pelo detector, o qual contém uma célula de fluxo que detecta a presença de um composto e envia um sinal elétrico. A resposta do detector é

tipicamente dependente da concentração do analito presente no detector, logo a quantificação é baseada na área do pico cromatográfico (Figura 5). Várias técnicas e tipos de detectores podem ser usados para a detecção de substâncias eluídas da coluna cromatográfica, dentre eles estão; detectores de absorção UV-Vis espectrofotométrica, sendo o mais comum, detector de fluorescência, índice de refração (RI), espectrometria de massa e dentre outros. (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

Figura 5 - Modelos de cromatograma mostrando vários picos e seus tempos de retenção.



Fonte: MOLDOVEANU; DAVID, 2017.

A fase móvel, assim como a coluna cromatográfica, exerce um papel importante nas separações cromatográficas de HPLC. A fase móvel consiste em uma ou mais misturas de solventes líquidos podendo ou não conter aditivos que contribuam para modificação do pH da fase móvel ou da força iônica (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

Já a coluna cromatográfica, é um tubo feito de metal preenchido com uma fase estacionária, que consiste em pequenas partículas sólidas com material poroso que possui características físicas e químicas específicas para permitir a separação dos analitos, com diâmetro interno de 2,1-4,6 mm e de 30-250 nm de comprimento e tem como objetivo realizar a separação dos componentes da amostra (SARKER; NAHAR, 2015).

A Tabela 1 apresenta diferentes tipos de fase estacionária e seus modos de operação.

Tabela 1 - Diferentes tipos de fase estacionária.

Fase estacionária	Modo de operação
C6 sílica	Fase reversa
Sílica C8	Fase reversa
Sílica c18	Fase reversa
Sílica	Fase normal
Diol	Fase normal e reversa
Ciano (CN)	Fase normal e reversa
Ácido benzeno sulfônico	Troca catiônica forte
Poliestireno	Exclusão de tamanho

Fonte: SARKER; NAHAR, 2015.

A variedade de possibilidades de selecionar diferentes fases móveis e colunas cromatográficas permitiu o desenvolvimento de vários tipos de HPLC e métodos analíticos. O HPLC de fase normal (NP-HPLC), o qual não é o mais comum, consiste em uma fase estacionária polar e de uma fase móvel apolar para a separação analítica. As fases móveis apolares usadas na NP-HPLC são solventes como hexano, CH₂Cl₂ (diclorometano), tetrahidrofurano, enquanto normalmente os analitos são lipídios, vitaminas lipossolúveis, esteroides e não eluem com fases móveis polares (SARKER; NAHAR, 2015).

HPLC de fase reversa (RP-HPLC) é a técnica analítica mais utilizada na indústria farmacêutica para quantificação de princípios ativos, produto de degradação, caracterização de impurezas e determinação de drogas e metabólitos em amostras biológicas. Técnica presente principalmente nas áreas de desenvolvimento, fabricação de medicamentos e no controle de qualidade. (YABRÉ et al, 2018).

Os métodos de RP-HPLC desenvolvidos são exatamente o inverso de NP-HPLC, em que a fase estacionária é não polar e consiste em uma fase móvel moderadamente polar. A fase estacionária mais comum em RP-HPLC é a sílica C18 ou uma sílica modificada com um grupo alquil de cadeia linear lateral. A fase móvel polar usada em RP-HPLC é geralmente uma mistura de água com solvente orgânico, geralmente acetonitrila (ACN) e/ou MeOH (SNYDER; KIRKLAND; JOHN, 2013). A Tabela 2 apresenta os solventes mais usados em RP-HPLC.

Tabela 2 - Fases móveis comumente usadas em RP-HPLC.

Fase móvel	Índice de polaridade	Comprimento de onda (nm)
Acetonitrila	6,2	190
Isopropanol	4,3	210
Metanol	6,6	205
Tetraidrofurano	4,2	212-230
Água	9,0	180

Fonte: SNYDER; KIRKLAND; JOHN, 2013.

5.2 TOXICIDADE DOS SOLVENTES ORGÂNICOS EM RP-HPLC

A grande maioria dos métodos de separação analítica por RP- HPLC utiliza uma fase móvel composta por uma mistura de água e solventes orgânicos. Acetonitrila e metanol são preferencialmente os solventes mais utilizados em RP-HPLC devido às suas propriedades físico-químicas serem muito atraentes para aplicações em cromatografia líquida. Ambos os solventes apresentam baixa viscosidade, reatividade química mínima, são completamente miscíveis com água e baixíssima absorção de UV em comprimentos de onda de interesse em análise química por HPLC (190 nm e 205 nm para ACN e MeOH, respectivamente) Tabela 2.(SNYDER et al.,2009). No entanto, acetonitrila não é um solvente verde, uma vez que apresenta características como inflamabilidade, volatilidade e toxicidade, as quais são desfavoráveis ao meio ambiente e a saúde dos analistas, além disso gera resíduos que precisam ser descartados corretamente por serem prejudiciais ao ecossistema (CLARK; TAVENER, 2007)

De acordo com guia Q3C do ICH a acetonitrila e o metanol são classificados como solventes de classe 2, ou seja, o uso deve ser limitado devido à toxicidade intrínseca. No guia Q3C do ICH, são apresentados estudos do poder carcinogênicos da acetonitrila em ratos ocasionando aumento discreto na incidência de adenomas (DE KLERCK; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2012).

Os limites de toxicidade de para esta classe de solventes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Toxicidade dos solventes orgânicos.

Solvente	Exposição diária permitida (mg/dia)	Limite de concentração b (mg/kg)
Acetonitrila	4.1	410
Metanol	30	3000
Etanol	50	5000
Acetona	50	5000

Fonte: KLERCK; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2012.

6. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES

A maioria dos métodos analíticos convencionais, como descrito anteriormente, utilizam uma grande quantidade de reagentes tóxicos prejudiciais ao meio ambiente e a sociedade. Nesse contexto, a busca por métodos analíticos menos agressivos e o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de melhorar esse cenário tornaram-se a prioridade da química analítica verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010). O desenvolvimento de métodos analíticos verdes que priorizam a sustentabilidade é uma tendência. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para tornar os métodos analíticos mais ecológicos sem que haja perda de resolução. As abordagens utilizadas envolvem desde substituição e ou redução dos solventes orgânicos tóxicos, corridas cromatográficas mais curtas, mudança na tecnologia da coluna cromatográfica, taxa de fluxo de fase móvel baixa, utilização de fluido supercrítico. Novas técnicas e métodos também estão sendo exploradas, tais como: cromatografia líquida a alta temperatura, cromatografia líquida de ultra eficiência, cromatografia supercrítica (WELCH et al., 2010).

6.1. REDUÇÃO DE SOLVENTES

Uma das abordagens primárias para a redução de solventes orgânicos em RP-HPLC é através de separações analíticas realizadas em tempos mais curtos, resultando no menor consumo de fase móvel. Para aumentar a velocidade das análises sem que ocorresse a perda de eficiência na separação, muitas estratégias foram propostas, como o uso de colunas curtas com partículas pequenas, altas

taxas de fluxo e altas temperaturas e pressões. (OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017)

6.1.1. Efeito do diâmetro da coluna no consumo da fase móvel

Naijun Wu (2001) afirmou que a redução do diâmetro e do comprimento da coluna em LC resulta em redução geral no consumo de solventes em comparação com métodos convencionais, uma vez que colunas com diâmetro menor requerem vazões menores para obter separações semelhantes. Naijun Wu (2001) descreveu que ao mudar o diâmetro interno da maioria das colunas de HPLC comerciais de 4,6 mm para 3,0 mm leva a uma redução de 57% no volume de solventes e resíduos (WU; LIPPERT; LEE, 2001).

A Tabela 4 apresenta as dimensões, volume e consumo típico de uma coluna em função do diâmetro interno.

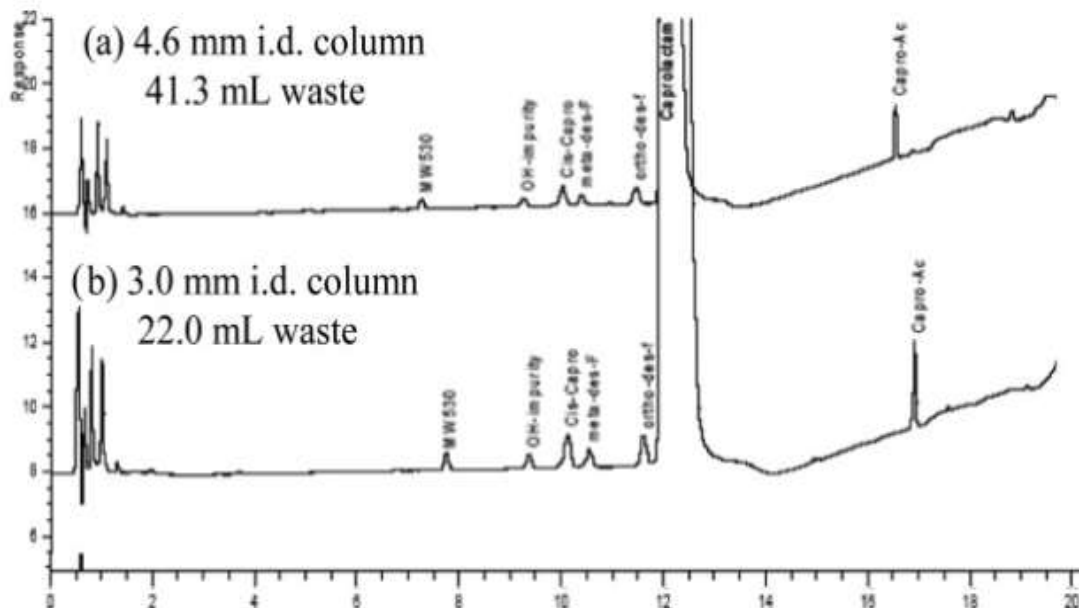
Tabela 4 - Consumo de solvente em função das dimensões da coluna de HPLC.

Dimensões da coluna (mm)	Volume da coluna (mL)	Consumo de solvente (mL)
9,0 x 250	10	80
4,6 x 250	2,5	19
4,6 x 150	1,5	12
4,0 x 80	0,50	4,5
2,1 x 150	0,30	2,5

Fonte: WU; LIPPERT; LEE, 2001.

Um exemplo de separação analítica mais verde usando um sistema convencional de HPLC com mudança no diâmetro da coluna foi apresentado por Welch et al. (2010) na Figura 6.

Figura 6 - Redução do consumo de solventes em função do diâmetro da coluna. Separação de seis impurezas do processo de um intermediário fármaco-substância utilizando na condição **(a)** uma coluna C18, 100 x 4.6mm, 2.7 μ m e em **(b)** uma coluna C18, 100 x 3.0mm, 2.7 μ m, ambas a uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min.



Fonte: WELCH et al., 2010.

Através da Figura 6, nas duas condições percebe-se que não houve uma diminuição no tempo de análise, com separação de 27,5 minutos. No entanto, apenas alterando o diâmetro interno da coluna e dimensionando a taxa de fluxo, o consumo de solvente e a geração de resíduos foram reduzidos em 47% sem haver nenhuma alteração na qualidade do cromatograma. (WELCH et al., 2010)

O comprimento da coluna, como já descrito, também pode reduzir o tempo de análise, no entanto, é necessário utilizar colunas empacotadas com partículas menores para que não haja perda na eficiência de separação. A desvantagem dessa abordagem é o aumento da pressão no sistema acima dos limites de 400bar, tornando incapaz de atuar com o sistema HPLC. (GUILLARME et al., 2010)

6.1.2 Separação rápida usando UHPLC

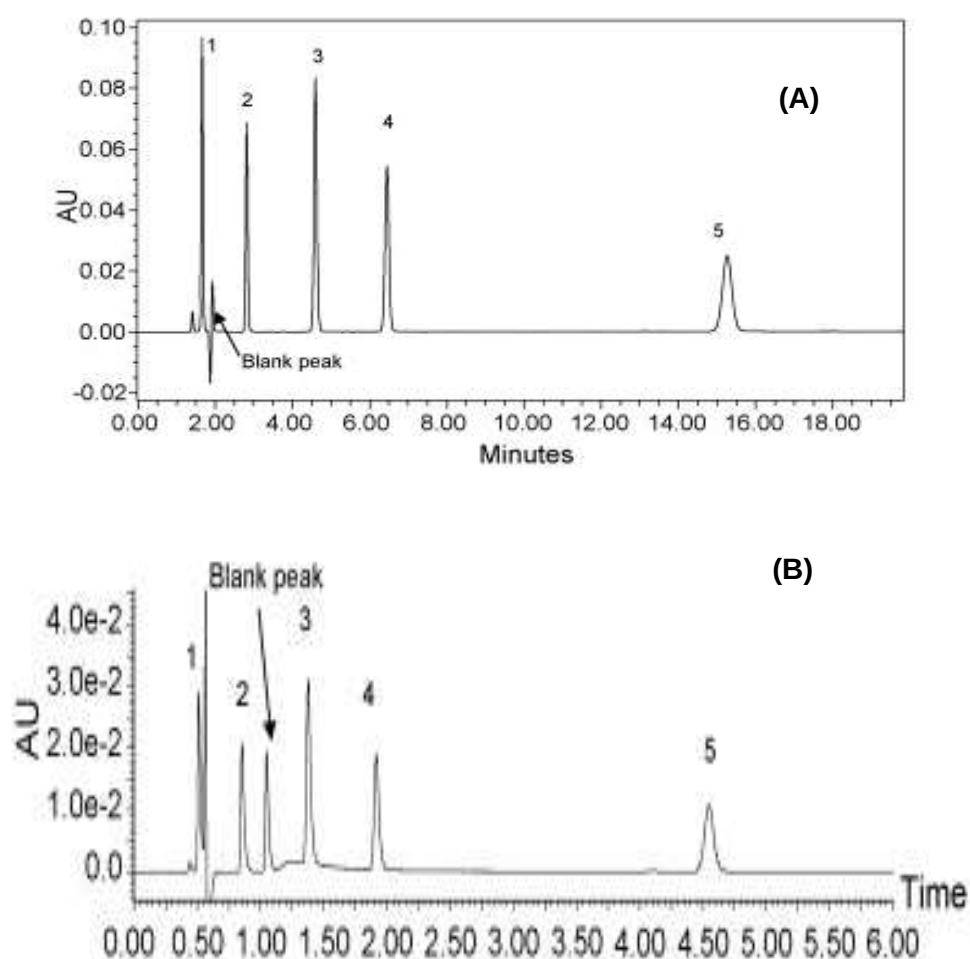
A cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC) baseia-se nos mesmos princípios de separação do HPLC, porém com o uso de coluna cromatográfica de dimensões reduzidas, normalmente colunas empacotadas com partículas sub-2 μ m. Estas partículas permitem a redução do tempo de análise sem perda de eficiência e

resolução, porém tem como requisito uma contrapressão maior do que 400 bar (PETERSSON; EUERBY, 2007).

A economia no consumo de solvente usando as partículas sub-2 μm é mais favorável em colunas curtas e estreitas. É importante mencionar que nem todo sistema de UHPLC é verde, uma vez que a economia de solvente pela redução do tempo da análise pode ser compensada pelo aumento do consumo de solvente através de uma vazão volumétrica maior (PŁOTKA et al., 2013).

Chen e Kord (2009) realizaram um estudo de comparação experimental do consumo da fase móvel entre UHPLC e HPLC. A Figura 7 representa os cromatogramas do estudo.

Figura 7 - Comparação entre (A) HPLC e (B) UHPLC.



Fonte: CHEN; KORD, 2009.

O objetivo do estudo era converter um método HPLC em UHPLC como uma estratégia verde para redução do consumo de solventes orgânicos. As condições de cada método são ilustradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condição cromatográfica entre HPLC e UHPLC.

Sistema	Coluna	Tempo	Fluxo	Volume
HPLC	Xbridge de 150 mm × 4,6 mm, 3,5µm	15 minutos	1,0 mL/min	15 mL
UHPLC	BEH 100 mm × 2,1 mm e 1,7 µm	4,6 minutos	0,5mL/min	2,3 mL

Fonte: Adaptado pelo autor.

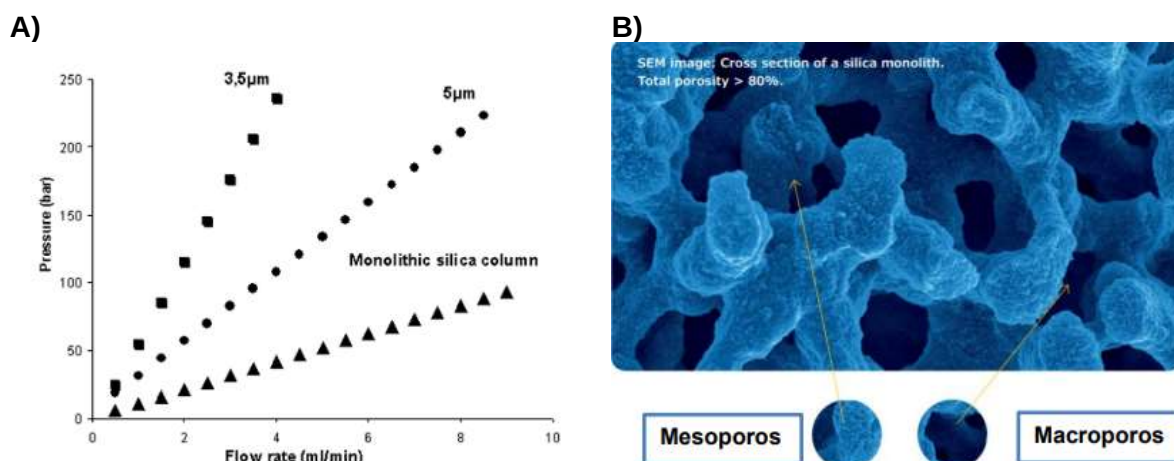
O resultado experimental indicou que o UPLC consumiu apenas 15,1% da fase móvel quando comparado com o HPLC e economizou 84,9% da fase móvel e custos associados, incluindo descarte de resíduos. O tempo de corrida para a estimativa do volume gasto foi referente ao tempo de retenção do último analito em ambos os métodos (CHEN; KORD, 2009).

6.1.3. Avanços tecnológicos *pró-eco friendly* em colunas de HPLC

As colunas monolíticas de HPLC podem ser usadas como ferramentas para esverdear os métodos analíticos, uma vez que seu uso possibilita diminuir o consumo de reagentes orgânicos durante as análises (GUILLARME et al., 2010). Essas colunas por possuírem maior porosidade, como ilustra a Figura 8-(B), oferecem menor resistência à vazão da fase móvel, podendo ser alcançadas altas taxas de fluxo com separações mais rápidas e eficientes sem que haja aumento da pressão. Essa técnica também permite o uso de fase móvel mais viscosa, como EtoH / água, em sistemas de HPLC convencionais, sem impactar a pressão (SHAABAN; GÓRECKI, 2015).

A Figura 8-(A) mostra a contrapressão nas colunas com taxas de fluxo diferentes. A coluna de sílica monolítica apresenta contrapressão mais baixa do que as colunas convencionais embaladas com partículas 3,5 µm e 5 µm, o que permite serem operadas em altas taxas de fluxo (CABRERA, 2004).

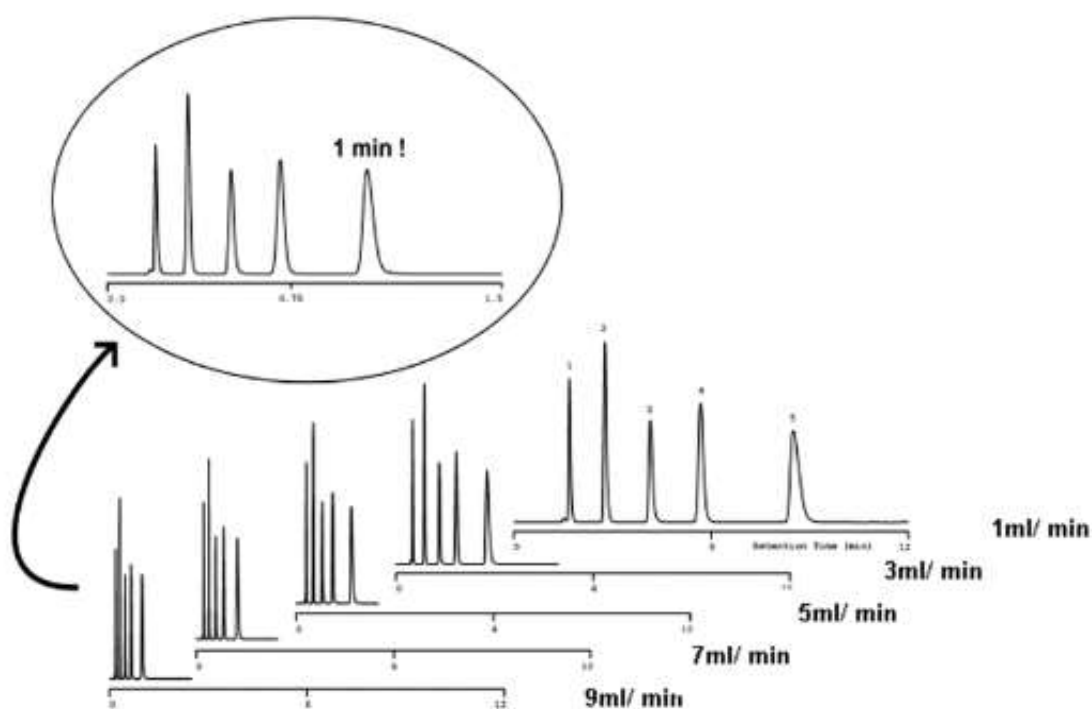
Figura 8 - Avaliação da contrapressão em coluna monolítica versus colunas particuladas a diferentes taxas de fluxo **(A)**. Estrutura interna das colunas monolíticas **(B)**.



Fonte: CABRERA, 2004; MERCK, 2020.

Cabrera (2004) descreveu que geralmente, as separações utilizando colunas de sílica monolítica podem ser conseguidas 5 a 10 vezes mais depressa do que com colunas embaladas. No entanto, a menos que o diâmetro da coluna seja reduzido, isso não resultará em economia de solvente.

Figura 9 - Separação de cinco B-bloqueadores utilizando uma coluna de sílica monolítica a diferentes taxas de fluxo.

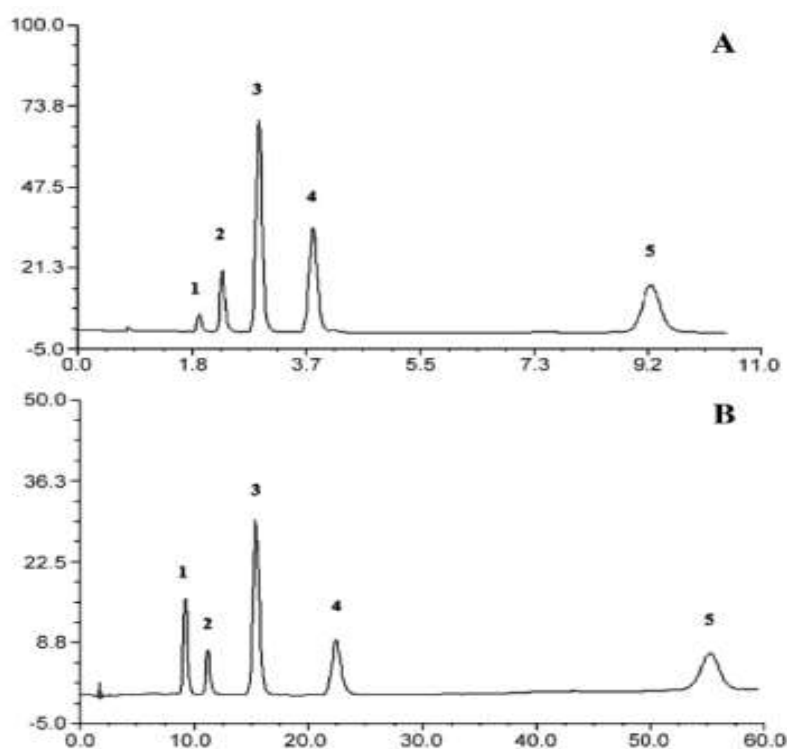


Fonte: ZACHARIS, 2009.

A Figura 9 mostra a separação de cinco medicamentos beta bloqueadores usando coluna monolítica a taxas de fluxos diferentes de 1 a 9 ml/min. É possível separar os cinco medicamentos no tempo de um minuto com o fluxo mais elevado. Percebe-se que quanto maior a vazão, menor é o tempo de análise.

Zacharis (2009) descreveu um estudo comparativo de desempenho cromatográfico para separação da Rifampicina e de suas impurezas usando uma coluna monolítica e uma coluna convencional.

Figura 10 - Separação da Rifampicina e das suas quatro impurezas em uma coluna monolítica **(A)** e em uma coluna convencional **(B)**.



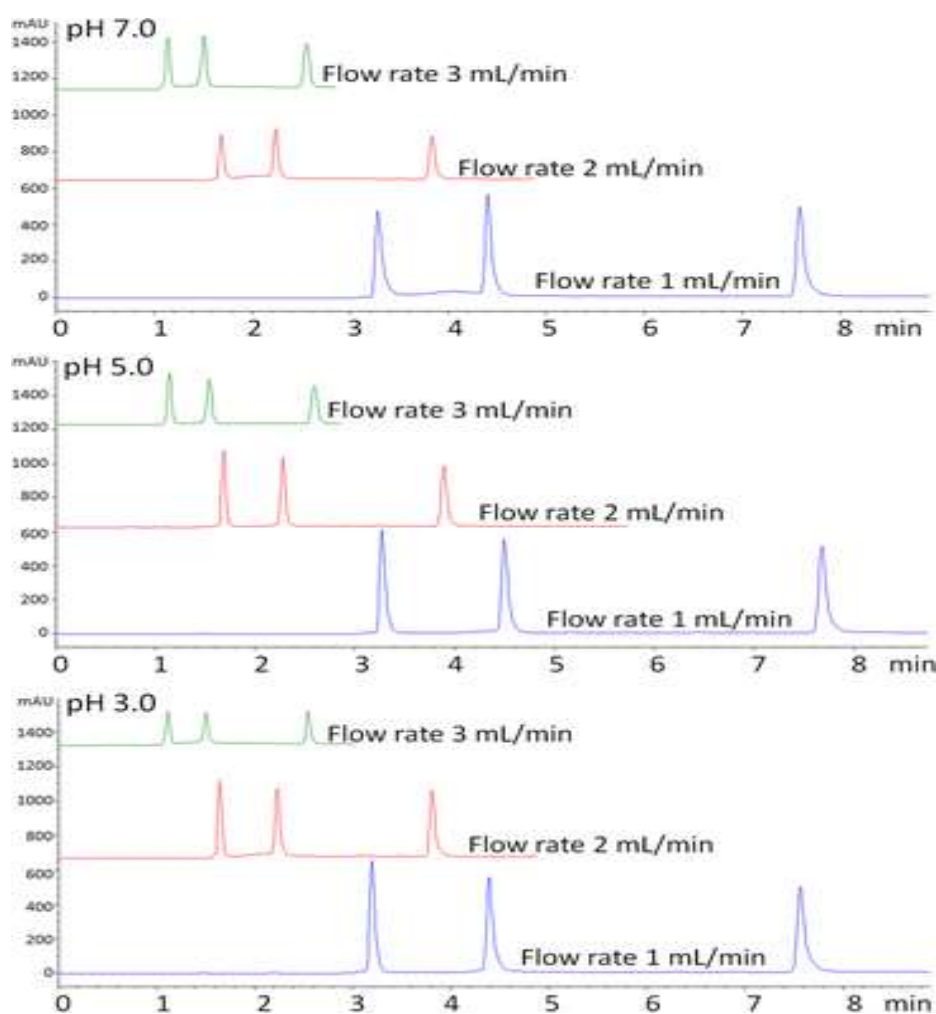
Fonte: ZACHARIS, 2009.

O método proposto utilizou uma coluna monolítica *Chromolith Performance* (RP-18e, 100mm × 4,6 mm i.d.) e como fase móvel constituída por uma mistura de fosfato, ácido, metanol e acetonitrila a uma taxa de fluxo constante de 2 mL/min. O método foi validado em termos de linearidade, precisão e exatidão. A coluna monolítica apresentou um melhor desempenho cromatográfico em comparação com uma coluna de partículas C18 (AT. *Chrom* C18, 150 mm × 4,6mm i.d.) com uma separação mais rápida da rifampicina e suas quatro impurezas em um tempo menor

do que 10 minutos como ilustra a Figura 10. Em contrapartida, a separação cromatográfica com a coluna particulada ocorreu em 56 minutos (ZACHARIS, 2009).

O desenvolvimento de métodos mais verdes utilizando os benefícios das colunas monolíticas já é uma realidade sendo implementada. Em 2016, Yehia e Mohamed desenvolveram um método de cromatografia líquida verde validado para a determinação simultânea de fenilefrina, paracetamol e guaifenesina em sua mistura ternária usando colunas monolíticas e solventes verdes como fase móvel. Foram planejados 9 experimentos variando a taxa de fluxo entre 1,0 ml, 2,0ml e 3,0ml/min e o pH da fase móvel em 3,0, 5,0 e 7,0. Todos os experimentos utilizaram coluna *Onyx* monolítica à temperatura ambiente, volume de injeção de 20 μ L e detecção UV realizada a 220 nm. Todos os 9 experimentos são apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Nove cromatogramas obtidos usando coluna *Onyx* Monolithic C18 (100x4,6mm) e tampão/etanol como fase móvel.



Fonte: YEHA; MOHAMED, 2016.

A separação cromatográfica ótima foi alcançada usando tampão fosfato pH 7,0/etanol como fase móvel com eluição gradiente linear de 100–75% de tampão fosfato a pH 7,0 em 3 min a uma taxa de fluxo de 2,0 ml/min. O tempo de execução foi de 4,0 minutos (YEHIA; MOHAMED, 2016).

O método RP-HPLC desenvolvido é considerado como uma alternativa mais ecológica e atende a todas as necessidades essenciais para ser identificado como um método verde, confiável e viável, tendo pontuação total na escala ecológica analítica de 86 (YEHIA; MOHAMED, 2016).

A Tabela 6 apresenta os pontos de penalidade na determinação do método em HPLC.

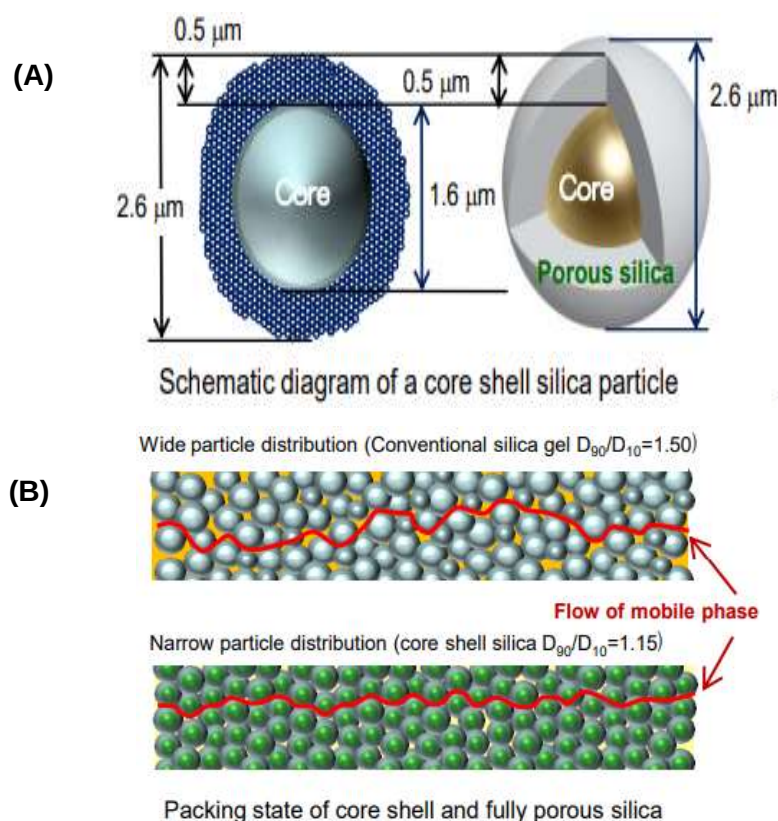
Tabela 6 - Os pontos de penalidade para a determinação do método HPLC proposto.

Reagentes	Pontos	Instrumentos	Pontos
Etanol	8	HPLC / UHPLC	0
Tampão fosfato	0	Risco Ocupacional	0
		Desperdício	6
TOTAL DE PENALIDADE = 8 + 6 = 14 PONTOS			
TOTAL DE PONTOS DA ESCALA ECOLÓGICA = 100 – 14 = 86			

Fonte: YEHIA; MOHAMED, 2016.

Outra estratégia para tornar os métodos analíticos mais sustentáveis é a utilização da tecnologia de colunas com partículas *Core-Shell*, as quais são partículas constituídas de um núcleo sólido rodeado por camadas de sílica (Figura 12-A). A vantagem dessas colunas é a menor resistência à transferência de massa, visto que o núcleo interno é sólido, logo impenetrável pelo analito, o que permite um caminho de difusão muito mais curto (Figura 12-B) (FEKETE; OLÁH; FEKETE, 2012)

Figura 12 - Estrutura interna da partícula Core-Shell **(A)**. Comparação do caminho da fase móvel em coluna convencional versus coluna com partícula Core-Shell **(B)**.

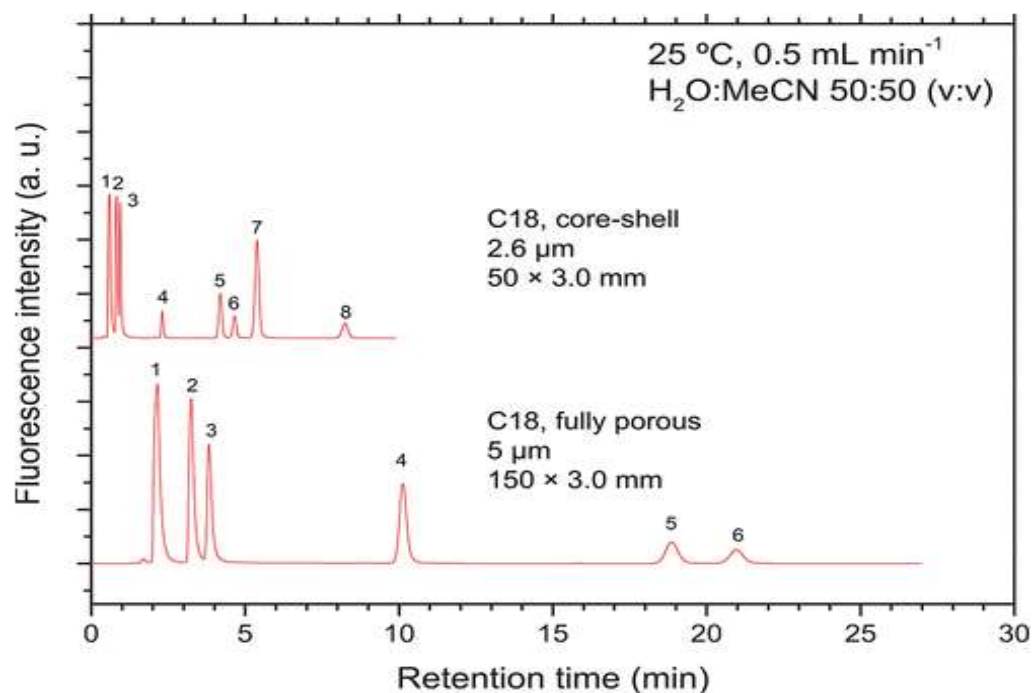


Fonte: FEKETE; OLÁH; FEKETE, 2012.

As colunas com essa tecnologia conseguem trabalhar com um fluxo maior em tempos menores sem afetar a pressão. Logo tornaram-se uma alternativa para reduzir o consumo de solventes em HPLC convencional e a diminuição da geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente (OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017).

Olives (2017) descreve que no estudo de desenvolvimento de metodologias analíticas sustentáveis realizado por González-Ruiz (2017), o volume de acetonitrila utilizado na análise dos antitumorais derivados da camptotecina foi reduzido em 71% usando partículas de núcleo-casca de 2,6 μm em comparação com partículas de sílica totalmente porosas de 5 μm , como mostra a Figura 13.

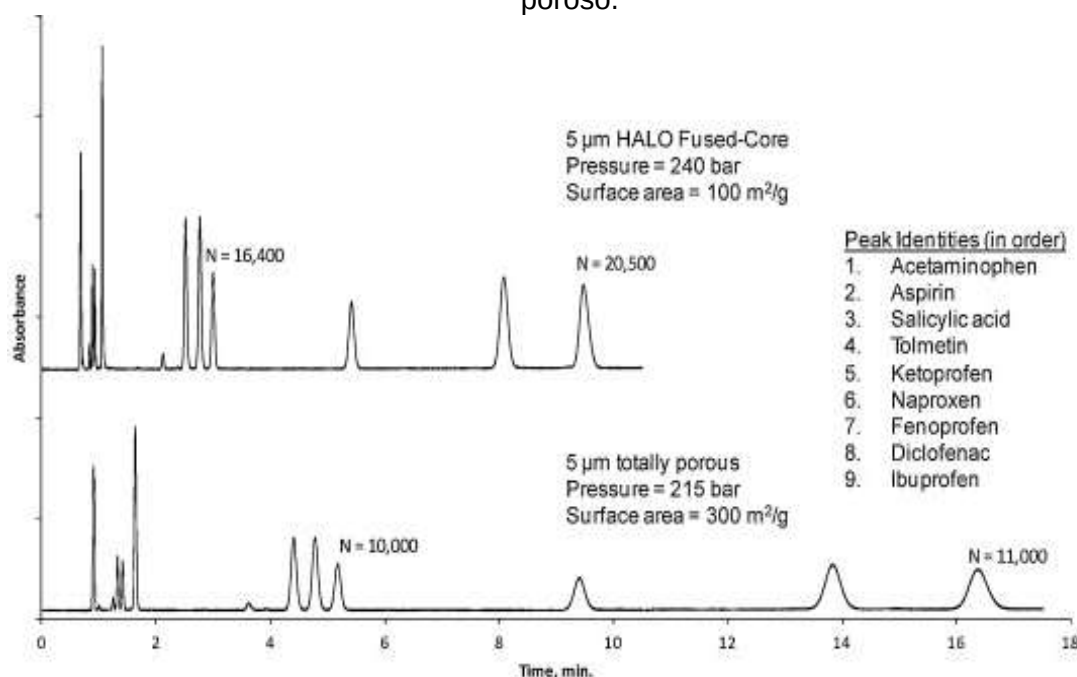
Figura 13 - Cromatogramas ilustrando a separação isocrática de drogas citotóxicas em duas colunas C-18 com tamanho e partículas diferentes.



Fonte: OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017.

Destefano et al. (2012) realizaram comparações de separação entre as colunas de núcleo casca e as colunas totalmente porosas (Figura 14).

Figura 14 - Separações comparativas com partículas de 5 μm : *Fused-Core* vs. totalmente poroso.



Fonte: DESTEFANO et al., 2012.

No estudo, Destefano et al. (2012) concluíram que a separação da mistura de anti-inflamatórios usando a tecnologia de núcleo casca apresentou cerca de metade do tempo da coluna de partículas totalmente porosas com eficiência de coluna melhor que 60%.

6.2. SUBSTITUIÇÃO DE SOLVENTES

O melhor cenário ecológico seria a eliminação do uso de solventes orgânicos em todas as análises, porém como isso é extremamente difícil de ser alcançado, a estratégia mais verde para reduzir o impacto de solventes perigosos é a substituição por solventes orgânicos menos tóxicos para o meio ambiente e à saúde (SHEN; CHEN; VAN BEEK, 2015).

Na literatura são descritos os seguintes solventes orgânicos mais aceitos como verdes que podem ser usados em RP-HPLC: principalmente o etanol, isopropanol, acetona, lactato de etila (TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017). Também são explorados métodos com a utilização de fase móvel 100% aquosa e de uso de CO₂.

6.2.1. Substituição de acetonitrila por etanol em RP-HPLC

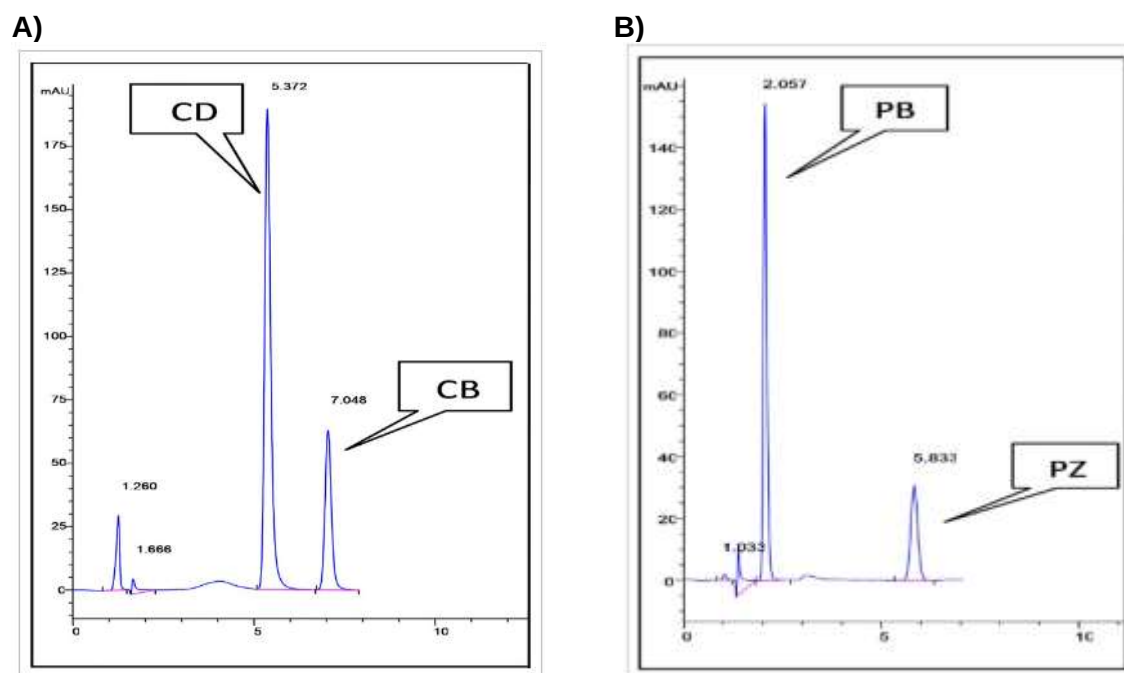
Etanol é considerado um solvente orgânico verde com grande potencial de substituir acetonitrila e metanol em análises RP-HPLC sem que haja perda de resolução. Apesar do etanol não ser um bom eluente como acetonitrila, apresenta características semelhantes, porém com menor volatilidade, menor custo de descarte e principalmente menor toxicidade (YABRÉ et al., 2018).

Estudos recentes sobre a viabilidade da substituição da acetonitrila por etanol vêm sendo publicados. Eman S Elzanfaly et al (2015), no estudo de determinação de formulações farmacêuticas, comprovaram que o método verde desenvolvido utilizando EtOH/água como fase móvel pode substituir métodos convencionais e reduzir o impacto ambiental (ELZANFALY et al., 2015).

No método de HPLC desenvolvido, a separação cromatográfica e a quantificação foram realizadas em temperatura ambiente com uma coluna Zorbax SB-C 18 Coluna (4,6 mm × 75 mm id, 3,5 µm), com um sistema isocrático composto por fase móvel etanol: água na proporção (50:50, v/v) e detecção em 210 nm e 220

nm. Os cromatogramas, apresentados na Figura 15, comprovam boa separação e simetria de pico, além de redução no tempo de retenção (ELZANFALY, et al., 2015)

Figura 15 - Cromatogramas obtidos por HPLC na análise das misturas CB/CD, PB/PZ.



Fonte: ELZANFALY, et al., 2015.

O método foi validado em relação à linearidade, precisão, exatidão e robustez, com resultados de acordo com os requisitos da *United States Pharmacopeia (USP)* como mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de adequação do sistema dos métodos propostos.

Parâmetros	Método proposto CB	Método proposto CD	Método proposto PB	Método proposto PZ	Método proposto MB	Método proposto SUL	Método proposto CPH	Método proposto CAF	Método proposto CTH	Valores de referência ⁽ⁱ⁾
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	$R_s > 2$
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.

Nos métodos convencionais, os tempos de corrida variaram de 5 a 25 minutos com produção de resíduos de 6 a 25g/corrída. Em contrapartida, no método verde apresentou tempos de retenção menores, com diminuição da quantidade de resíduos, 2,4-5,4mL/corrída e diminuição do consumo de solventes como ilustra a Tabela 8 a seguir:

Tabela 8 - Comparação entre método proposto e o convencional.

Mistura	Método	Fase móvel	Consumo	Resíduo
CB/CD	Proposto	Etanol/água (50:50, v/v).	3,25 mL	3,25 g/corrída
CB/CD	Reportado	ACN / MeOH/ CH ₃ COONH ₄	25 ml	25 g/corrída
PB/PZ	Proposto	Etanol/água (50:50, v/v).	3,25 ml	3.25 g/corrída
PB/PZ	Reportado	ACN / MeOH/(NH ₄) H ₂ PO ₄	15 ml	15 g/corrída

Fonte: Autor.

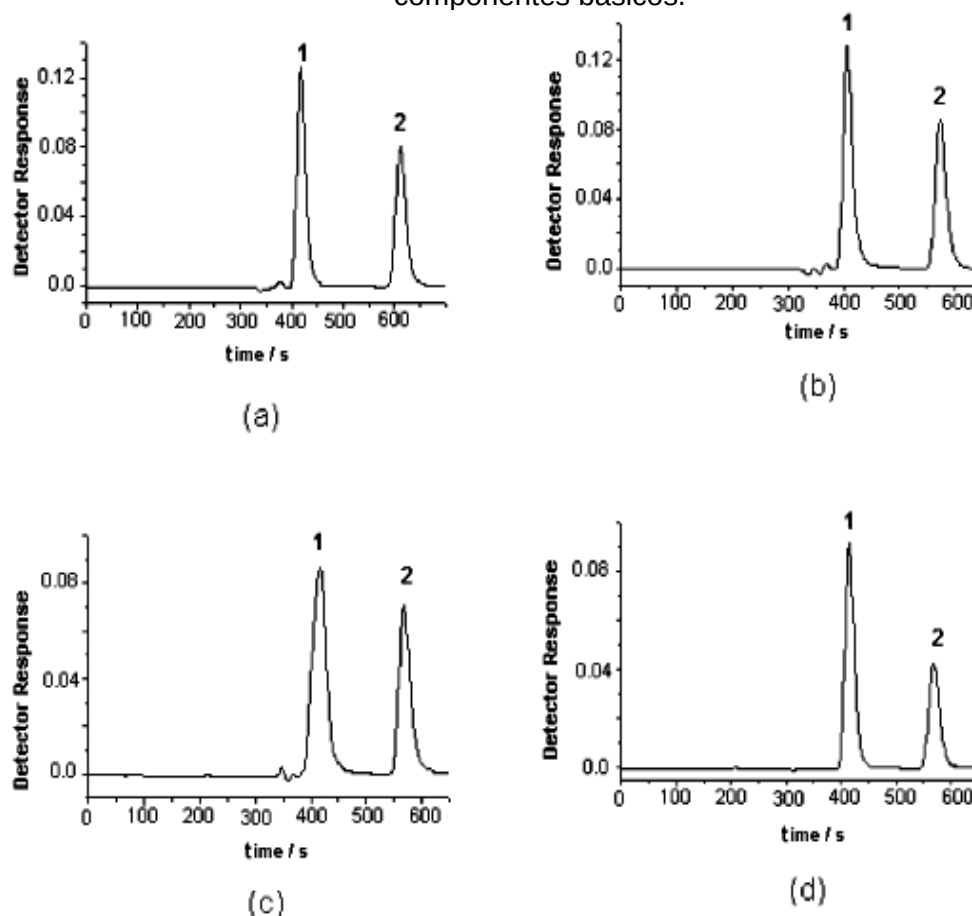
A eficiência cromatográfica utilizando EtOH/água como fase móvel em RP-HPLC também foi avaliada por Ribeiro et al em um estudo comparativo com constituições de fase móvel diferentes utilizando ACN, metanol e EtOH em colunas C8 e C18 (RIBEIRO et al., 2004).

Através do estudo de Ribeiro et al. (2004), foi concluído que a substituição de ACN ou MeOH por EtOH resultou em eficiência de pico semelhante para a análise cromatográfica de separação de compostos neutros e básicos, os quais podem ser visualizados na Figura 16. As composições e taxas de fluxo de cada fase móvel são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição e condições otimizadas para todas as fases móveis.

Column	Mobile phase	Temperature (°C)	N/L ^b	N/L ^c	R _s ^{bc}	A _s ^b	A _s ^c	k ^b	k ^c	t _R (min) ^b	t _R (min) ^c
C8	EtOH:H ₂ O	25	16300	27200	5.6	1.6	1.5	0.3	0.9	7.0	10.2
	EtOH:H ₂ O	40	18800	26200	4.9	1.5	1.7	0.2	0.7	6.8	9.5
	MeOH:H ₂ O	25	7900	23500	3.4	1.0	1.6	0.2	0.6	7.0	9.5
	ACN:H ₂ O	25	18100	25300	4.5	1.5	1.3	0.3	0.8	6.9	9.5
C18	EtOH:H ₂ O	25	16400	25100	7.8	1.6	1.7	0.2	0.8	6.6	11.6
	EtOH:H ₂ O	40	15700	23500	7.0	1.5	1.6	0.2	0.8	6.4	10.9
	MeOH:H ₂ O	25	6800	18300	4.8	0.9	1.7	0.2	1.0	6.6	10.6
	ACN:H ₂ O	25	14800	21300	5.5	1.3	1.3	0.2	0.8	6.5	10.0

Fonte: RIBEIRO et al., 2004.

Figura 16 - Cromatogramas obtidos com uso da coluna C18 para separação dos componentes básicos.

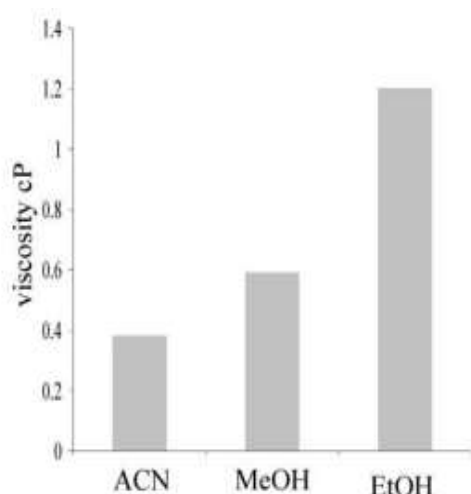
Fonte: RIBEIRO et al., 2004.

O uso da fase móvel EtOH: água foi cromatograficamente muito semelhante às fases móveis com uso de ACN e MeOH comprovando que o etanol pode substituir ACN e MeOH sem afetar a eficiência das separações cromatográficas.

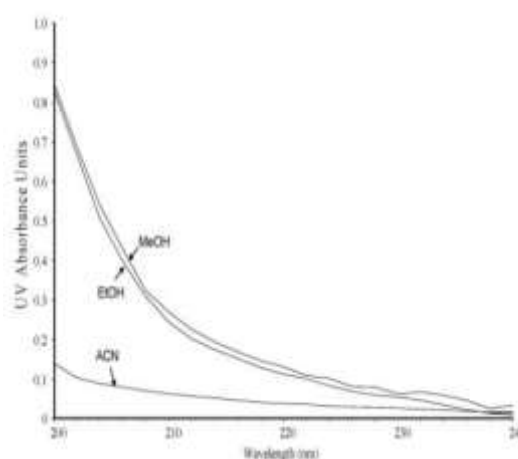
Apesar do potencial do EtOH em métodos de RP-HPLC, este solvente apresenta algumas desvantagens que podem dificultar a sua utilização em alguns métodos de rotina. O Etanol apresenta absorção no UV em 210 nm maior que o MeOH e ACN (Figura 17-B), o que pode ocasionar um aumento na linha de base e no sinal ruído durante a corrida cromatográfica. Um outro ponto importante é que a fase móvel EtOH/água apresenta maior viscosidade (Figura 17-A) em temperatura ambiente do que a mistura ACN/água e MeOH/água ocasionando uma maior resistência eluotrópica e consequentemente afetando diretamente a pressão do sistema. O autor Afshar (2013) afirmou, no estudo sobre determinação de isômeros de permetrina através de métodos *eco friendly* (AFSHAR; SALKHORDEH; RAJABI, 2013), que por natureza o etanol tem o dobro da viscosidade do MeOH e quase 4 vezes a viscosidade da ACN.

Figura 17 - Comparação das propriedades físicas entre ACN, MeOH e EtOH.

A) Viscosidade dos solventes



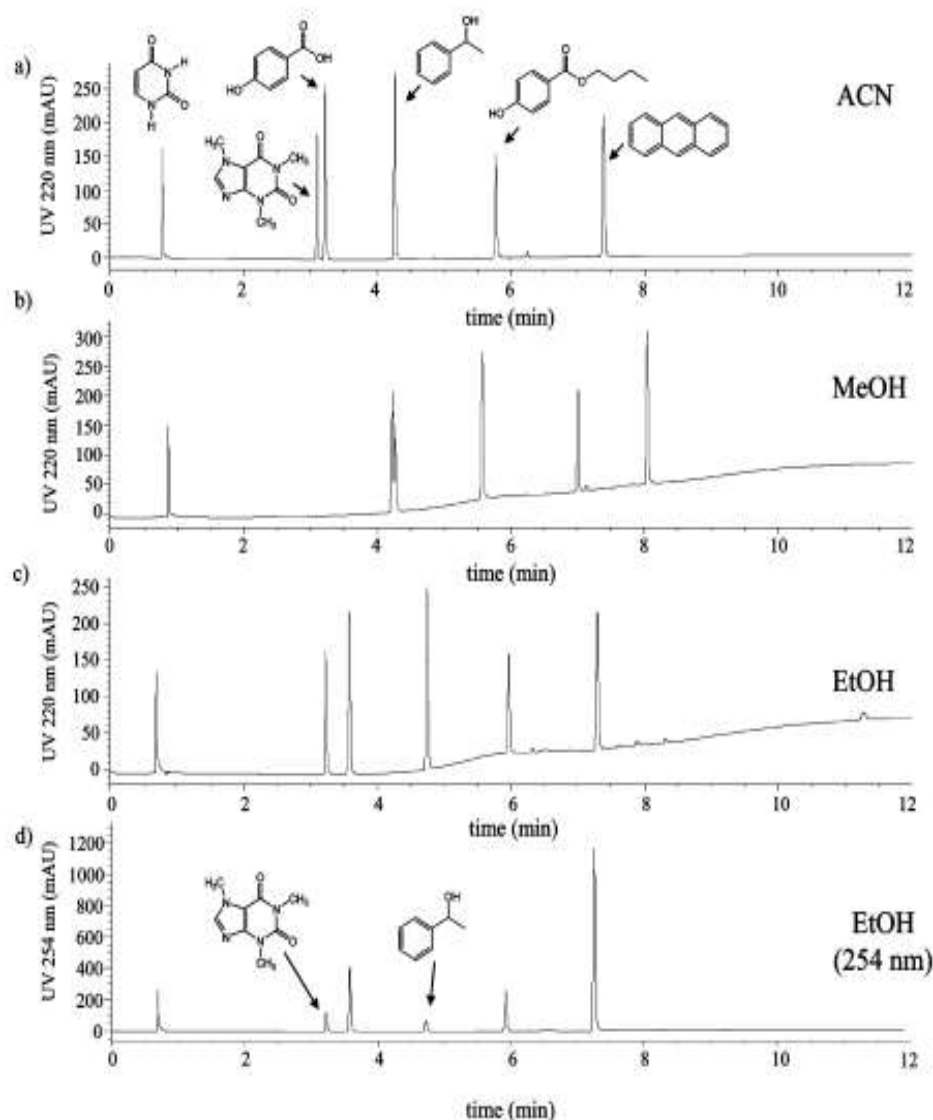
B) Corte no UV



Fonte: WELCH et al., 2009

A desvantagem do EtOH versus o seu potencial de ser utilizado em RP-HPLC foi estudado por Welch et al. (2009) na pesquisa sobre reavaliação da escolha da acetonitrila como solvente em cromatografia. Os cromatogramas a seguir ilustram as 3 condições analíticas estudadas utilizando solventes diferentes nos mesmos parâmetros cromatográficos.

Figura 18 - Separação por RP-HPLC utilizando três modificadores orgânicos diferentes.



Fonte: WELCH et al., 2009.

A qualidade da linha de base e das separações analíticas utilizando ACN é inegável, no entanto Welch et al. (2009) conclui que a diferença de desempenho entre os solventes é pequena. A desvantagem da ascensão da linha de base na condição do EtOH em 210 nm, ocasionada pela sua absorção significativa no UV nesse comprimento, como ilustrado na Figura 17, pode ser revertida utilizando comprimento de onda 254 nm. Um ponto importante a ser destacado é a perda da qualidade da detecção dos analitos 2-feniletanol e da cafeína quando a análise é realizada no comprimento de onda maior. Porém a utilização de tecnologias modernas de coluna e temperaturas elevadas podem solucionar esses problemas permitindo o etanol como alternativa de solvente verde viável em algumas situações.

O grande número de aplicações presentes na Tabela 10 a seguir prova que essas limitações podem ser superadas.

Tabela 10 - Análises farmacêuticas em RP-HPLC usando fases móveis à base de etanol.

Análise	Coluna	Fase móvel	Fluxo	Condição	Ref
Prednisolone	Phenomenex C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/água (30:70, v/v)	0.8 mL/min	50°C e UV (254 nm)	[42]
Diltiazem	C18 coluna (250 × 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/H ₃ PO ₄ (pH 2.5) (35:65, v/v)	2 ml/min	50°C e UV (240 nm)	[43]
Ampicilina sódica	Zorbax C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/água (40:60, v/v)	0.5 ml/min	25°C e UV (210 nm)	[55]
Estatinas	ODS-AQ YMC C18 (50 × 4.6 mm, 3 µm)	EtOH/25 mM ac fórmico (pH 2.5) (50:50, v/v)	1 ml/min	40°C e UV (238 nm)	[5]
Daptomicina	Zorbax C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/água (55:45, v/v) pH 4.5 com ácido acético glacial	0.6 ml/min	25°C e UV (221 nm)	[56]
Paracetamol	Onyx Monolithic C18 (100 × 4.6 mm)	Eluição gradiente de tampão EtOH/fosfato (pH 7)	2 ml/min	Temperatura ambiente e UV (220 nm)	[48]
Hidroclorotiazida	Intersil ODS-3 C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/20 mM tampão fosfato (pH 7) (70:30, v/v)	0.7 ml/min	25°C e UV (240 nm)	[52]

Ref = referência bibliográfica. Fonte: Adaptado pelo Autor.

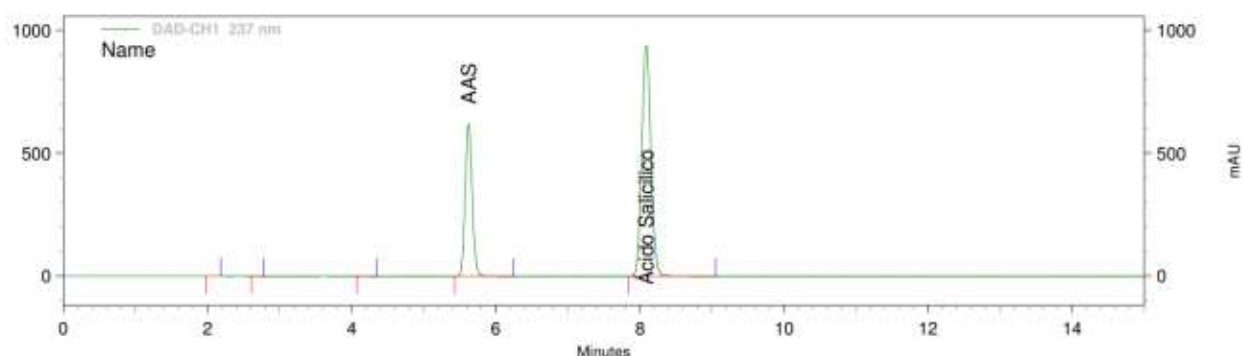
6.2.2. Cromatografia líquida de alta temperatura - HTLC

Uma das estratégias para reduzir a viscosidade da fase móvel EtOH/água é a realização de separação analítica em temperaturas elevadas através do sistema de cromatografia líquida de alta temperatura (HTLC) (GREIBROKK; ANDERSEN, 2003). Ao elevar a temperatura, a viscosidade da fase móvel diminui e consequentemente ocorre a diminuição da pressão no HPLC. Borges et al afirma que o aumento de pressão no sistema HPLC, devido a viscosidade do EtOH, pode ser resolvido com temperaturas entre 40-60 °C (BORGES; BOTTOLI; COLLINS, 2010).

Modeneze (2022) no estudo de desenvolvimento de um método verde de RP-HPLC para quantificação ácido acetilsalicílico abordou o efeito da temperatura como

estratégia para diminuir a viscosidade e a pressão quando utilizado EtOH como fase móvel. No método farmacopeico, representado pela Figura 19, a composição da fase móvel era ACN:H₂O: (40v:60v), com tempo de corrida de 10 minutos e tempo de retenção do analito de interesse (AAS) de 5,8 minutos e do ácido salicílico de 8,1 minutos, com temperatura de 25 °C.

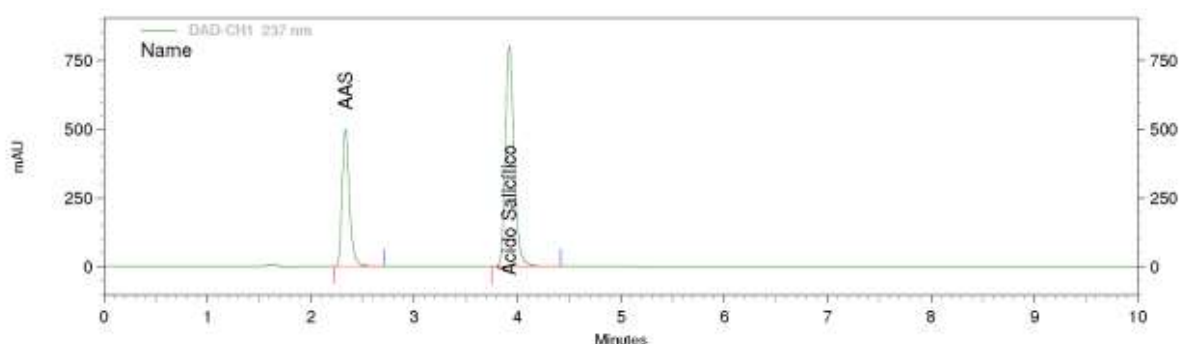
Figura 19 - Método farmacopeico na condição 1.



Fonte: MODENEZE, 2022.

O método verde desenvolvido propôs substituir a acetonitrila por EtOH e utilizar uma coluna com novas tecnologias para acelerar o método analítico. Foi obtido com sucesso uma corrida mais rápida utilizando um solvente verde e com tempo de retenção do analito de interesse (ASS) menor, como mostra a Figura 20 a seguir

Figura 20 - Método na condição 2.

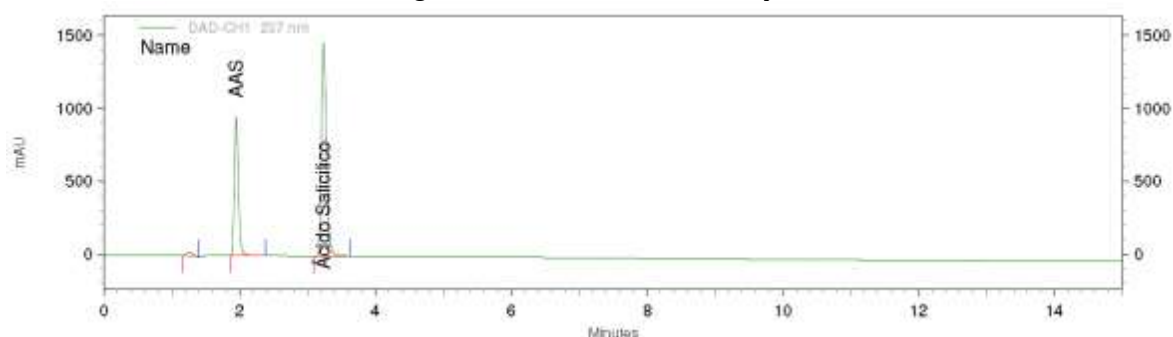


Fonte: MODENEZE, 2022.

No entanto, devido à alta viscosidade do etanol, a pressão no sistema HPLC elevou-se a um ponto próximo do limite recomendável e o método apresentou

assimetria dos picos em torno de 2,1, ou seja, fora dos parâmetros aceitáveis. Como solução foi proposto um método de HTLC para diminuir a viscosidade da fase móvel e consequentemente diminuir a pressão. A Figura 21 mostra o cromatograma com temperatura do forno elevada até 45°C.

Figura 21 - Método na condição 3.



Fonte: MODENEZE, 2022.

Como resultado foi obtido uma separação analítica com tempo de corrida mais curto, pressão mais baixa e picos mais finos. Os valores de assimetria de pico mudaram de 2,1 para valores dentro da especificação, em torno de 1,2. Conclui-se a possibilidade do HTLC ser uma estratégia a contribuir na viabilidade do uso do EtOH como solventes verdes em substituição da ACN em métodos convencionais, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação das condições cromatográficas em DAD-237 nm.

Condição	Retenção	FM	Pratos teóricos	Resolução	Assimetria
01 - 25°C	ASS-5,8m	ACN:H2O	15786	8,85	1,07
02 - 25°C	ASS-2,3m	EtOH:H2O	7392	4,93	2,04
03 - 45°C	ASS-2,0m	EtOH:H2O	5160	4,66	1,26

Fonte: Adaptado de MODENEZE, 2022.

Embora o HTLC traga muitas vantagens, ele também apresenta limitações, uma delas é a estabilidade térmica das fases estacionárias. De fato, para a maioria das colunas à base de sílica usadas em condições de fase reversa, a temperatura máxima permitida não deve exceder 60 °C (HEINISCH; ROCCA, 2009). Aplicações

recentes de HTLC como uma abordagem verde em análises farmacêuticas são relatadas na literatura como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Aplicações de HTLC em análises farmacêuticas.

Análise	Coluna	Temp	Fluxo	Corrida	Referência
Clodronato	C18 (100 mm × 2,1 mm, 3 µm)	50°C	0,3 mL/min	-	[22]
Ritonavir	Waters Acquity BEH Shield RP18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm)	50°C	0,5 mL/min	20 mi	[26]
9 sulfonamidas	Coluna Zorbax SB C18 (150 mm × 4,6 mm, 1,8 µm)	60°C	1,5 mL/min	3 min	[45]
24 anti-inflamatórios não esteróides	Coluna Zorbax SB C18 (150 mm × 4,6 mm, 1,8 µm)	80°C	1,1 mL/min	28,4 min	[46]

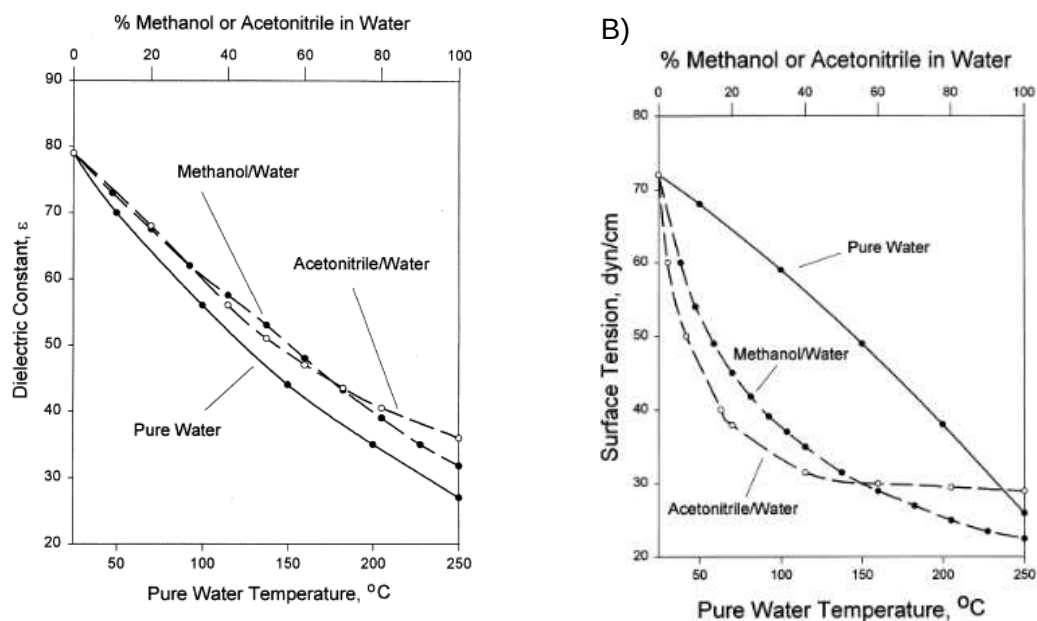
Fonte: Adaptado pelo Autor.

6.2.3. Substituição de solvente por fase 100% aquosa

Há um interesse em esverdear os métodos analíticos usando água pura como fase móvel em cromatografia líquida, devido às características ecologicamente sustentáveis da água, como por exemplo: disponibilidade, não inflamável, sem riscos de segurança para o manuseio (SHAABAN, 2016). No entanto, a água não pode eluir muitos analitos orgânicos em temperatura ambiente, porém em temperaturas elevadas a sua força de eluição aumenta (WELCH et al., 2010).

A cromatografia com água superaquecida (SHW) é considerada como uma alternativa verde para separações em RP-HPLC, que já está sendo aplicada em algumas análises farmacêuticas. Essa técnica é caracterizada pela mudança da polaridade da água sob o efeito de temperaturas elevadas e pressões moderadas para manter a água no estado líquido (HARTONEN; RIEKKOLA, 2008). Ou seja, a água líquida em altas temperaturas age mais como solvente orgânico devido ao fato da polaridade da água tornar-se semelhante a polaridade de uma mistura metanol ou acetonitrila com água nessas condições, como mostra a Figura 22.

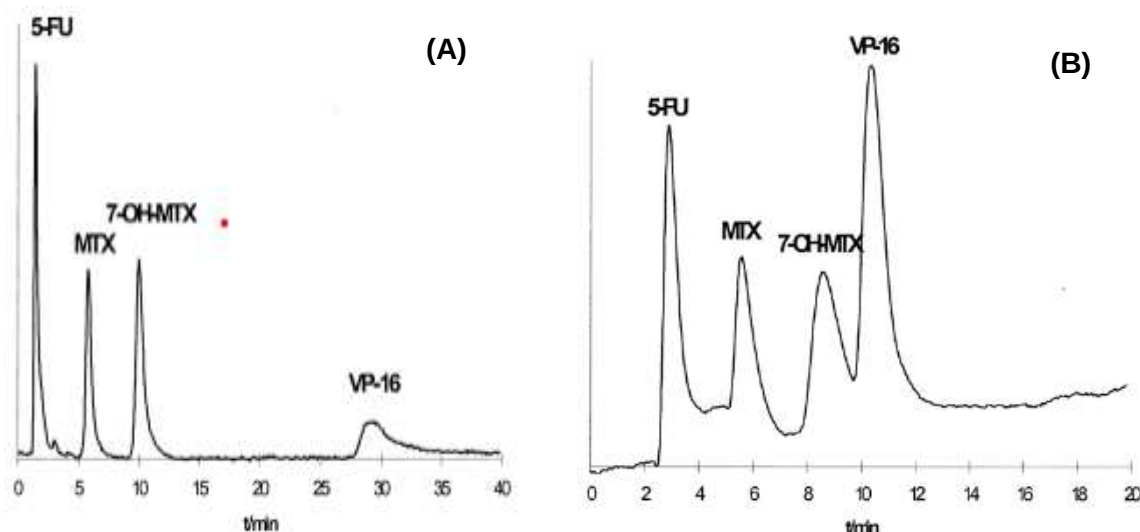
Figura 22 - (A) Controle da polaridade do eluente (constante dielétrica) alterando a temperatura da água. **(B)** Controle da tensão superficial do solvente alterando a temperatura.



Fonte: HARTONEN; RIEKKOLA, 2008 e YANG et al., 1998.

Para a água conseguir eluir os solutos da fase reversa são necessárias temperaturas mais altas do que 100°C graus para conseguir diminuir a tensão superficial, a constante dielétrica e a viscosidade, como mostra a Figura 22(B). No entanto, é preciso a utilização de colunas resistentes à temperatura, pois a água em acima de 100°C graus apresenta propriedades reativas que afetem a sílica das colunas convencionais de RP-HPLC (YANG et al., 1998).

Figura 23 - Separação de 5-fluorouracil(5-FU), metotrexato (MTX), 7-hidroximetotrexato (7-OH-MTX) e etoposido (VP-16) usando água superaquecida. **(A)** condição em 80 °C e **(B)** em 150 °C.



Fonte: TEUTENBERG et al., 2001.

A Figura 23 (B) representa o desenvolvimento de um método verde para a separação cromatográfica de vários medicamentos cancerígenos usando uma coluna PS-DVB e água tamponada (pH = 11) a 150°C, 1 ml/min e pH= 3,5, UV: 215 nm. Durante toda a investigação e dentro da faixa de temperatura desde a temperatura ambiente até 160 °C, nenhuma degradação da fase estacionária para a coluna PS-DVB foi observada (TEUTENBERG et al., 2001).

6.2.4 Substituição de solvente por CO₂

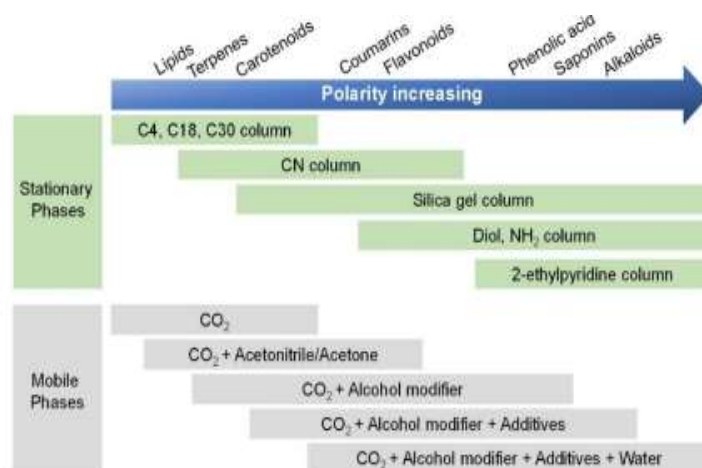
Assim como a água supercrítica discutida anteriormente, o uso de dióxido de carbono quando utilizado na forma supercrítica, ou seja, líquido, é um substituto para solvente orgânico em cromatografia verde.

O dióxido de carbono apresenta características interessantes tanto no meio ambiente quanto na indústria, como não inflamabilidade, abundância, baixo custo e não geração de resíduos tóxicos. No entanto, o CO₂ supercrítico puro tem propriedades altamente lipofílicas com baixa força de eluição para compostos polares, o que restringiu o seu uso apenas para análises de compostos lipofílicos e não despertou interesse das indústrias farmacêuticas inicialmente, visto que a

maioria dos medicamentos e suas impurezas são polares e com baixa solubilidade em CO₂ (DESFONTAINE et al., 2015).

A SFC (cromatografia utilizando CO₂) pode ser usada no modo de fase reversa quando se utiliza solventes orgânicos, como metanol, isopropanol e outros para melhorar a solubilidade do analito em CO₂ e para melhorar a polaridade (KLERCK; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2012) como ilustra a Figura 24 a seguir.

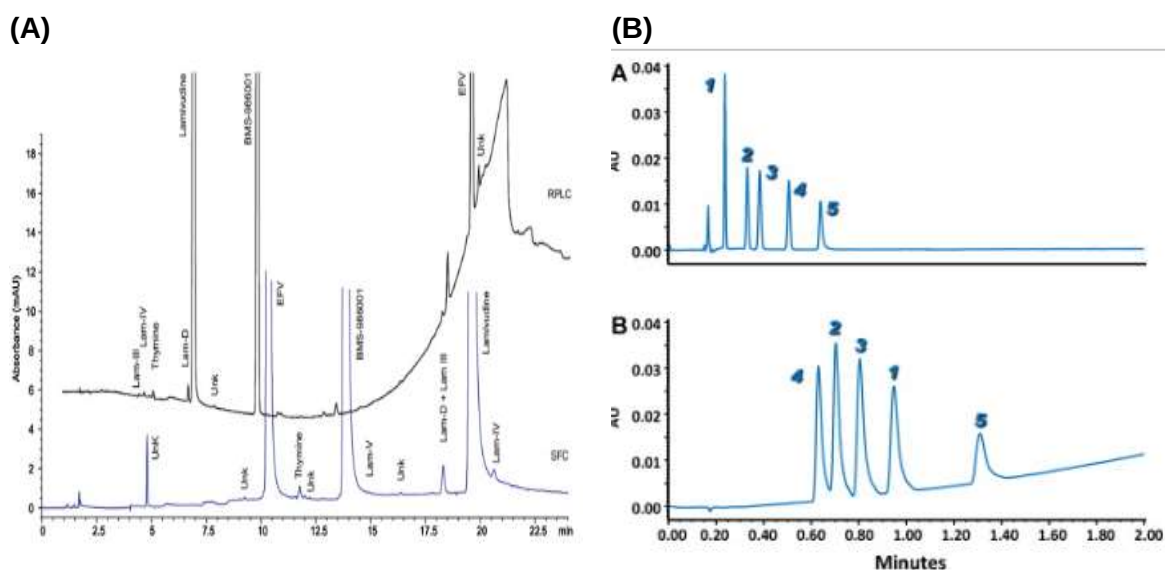
Figura 24 - Comparação da polaridade da fase móvel constituída de CO₂ com solventes orgânicos em relação a polaridade de diferentes fases estacionárias.



Fonte: ZOU; DORSEY; CHESTER, 2000.

Wei Zou (2000) observou que ao aumentar a proporção do modificador na fase móvel deve aumentar diretamente a força eluotrópica e assim diminuir os tempos de retenção. Também é observada uma melhora na resolução dos picos cromatográficos utilizando os modificadores juntos com CO₂ (ZOU; DORSEY; CHESTER, 2000).

Figura 25 - (A) Comparação do desempenho da análise por SFC e RP-HPLC. **(B)** Análise ultrarrápida de esteroides em condições SFC e UHPLC.



Fonte: GRAND-GUILLAUME et al., 2012.

O desempenho dos métodos analíticos SFC e RP-HPLC foram comparados por Grand-Guillaume et al (2012) para perfis de impurezas de medicamentos antirretrovirais em formulações de comprimidos Fig.25(B). O SFC apresentou picos cromatográficos mais uniformes, sem desvios de linha de base em relação ao método UHPLC, além do que forneceu a sensibilidade necessária para quantificar impurezas e produtos de degradação na área de 0,05-0,1%. (DE KLERCK; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2012).

O conceito de UHPLC pode ser implementado na técnica de CO₂ supercrítico utilizando colunas com micragem baixas para análises ultrarrápidas de esteroides. Uma mistura de 5 esteroides foi analisada por UHPSFC e por UHPLC representada pelo cromatograma na Fig.25(a). O UHPSFC apresentou tempo de análise reduzido para 0,7m e com melhor resolução de picos e sem flutuação da linha de base em comparação ao UHPLC (GRAND-GUILLAUME et al., 2012).

Com base no desempenho do uso do Co₂ em cromatografia, é possível desenvolver métodos analíticos mais verdes usando essa tecnologia que permite em alguns casos picos mais eficiente, métodos mais rápidos, consumo menor de solventes orgânicos e menor geração de resíduos tóxicos. Um método de SFC para a separação de quatro esteroides, quatro sulfonamidas e quatro anti-inflamatórios foi

realizado por Berger (2010), com o intuito de diminuir o tempo de corrida em comparação aos métodos convencionais. Foi observado altas eficiências e tempos de execução muito curtos, principalmente abaixo de 1 minuto, como mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Demonstração de altas velocidades com baixa pressão em SFC.

Análise	Coluna	Temp.	Fluxo	Corrida	Pressão
<u>Anti-inflamatórios:</u> ibuprofeno, flurbiprofeno, naproxeno cetoprofeno	3 × 100 mm 1,8 µm Zorbax RX-Sil	50 °C	2,5 mL min	0,8 min	150 bar
<u>Esteroides:</u> cortisona, hidrocortisona, prednison e prednisolona	3 × 100 mm 1,8 µm Zorbax RX-Sil	50 °C	2,75 mL min	0,9 min	150 bar
<u>Sulfonamidas:</u> sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfametizol	3 × 100 mm 1,8 µm Zorbax RX-Sil	65 °C	2,75 mL min	1 min	394 bar

Temp. = temperatura (° C).

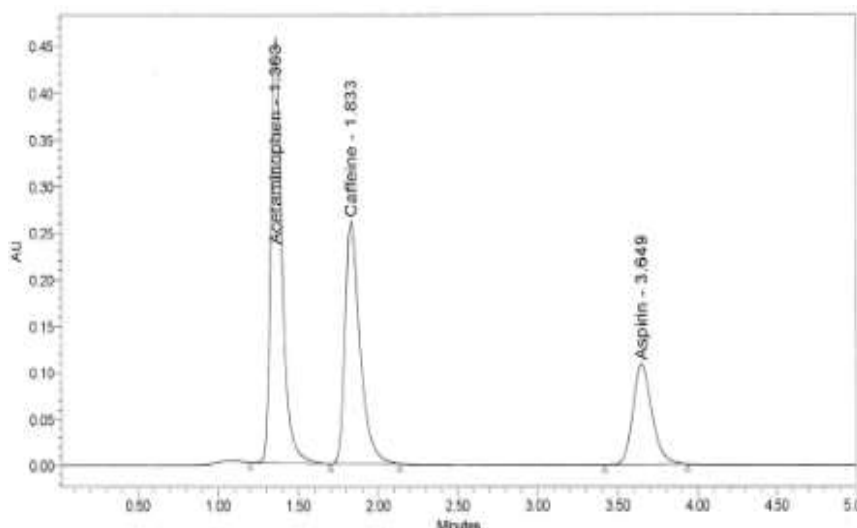
Fonte: BERGER, 2010.

6.2.5. Substituição por outros solventes orgânicos

A acetona é uma outra alternativa mais ecológica para substituição da acetonitrila e metanol em RP-HPLC. Esse solvente além de apresentar semelhanças físico-químicas com ACN, possui baixa toxicidade e menor geração de resíduos tóxicos. No entanto, a acetona não é muito viável nas maiorias das análises farmacêuticas de rotinas devido ao seu alto corte de UV em torno de 340, o que limita o seu uso com detecção de UV (FUNARI et al., 2015).

Outra alternativa de solvente mais verde é o uso de etil lactato, o qual é produzido industrialmente e foi avaliado a ser usado como modificador orgânico ecológico. A viabilidade do uso do etil lactato foi investigada por Judge et al (2013), o qual estudou a separação de linha de base de três analitos farmacêuticos (acetaminofeno, cafeína e ácido acetilsalicílico) utilizando uma fase móvel constituída por 87% de água, 10% de lactato de etila e 3% de ácido acético em uma coluna C18 Padrão a 60 °C (JUDGE; AAB, 2013), ilustrada pela Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma de paracetamol, cafeína e aspirina (ácido acetilsalicílico) utilizando 10% v / v de fase móvel de lactato de etila a 270 nm.



Fonte: JUDGE; AAB, 2013.

O uso de etil lactato como modificador ecológico produziu cromatogramas aceitáveis Figura 26 com cada um dos três analitos exibindo um formato de pico comparável ao obtido ao usar metanol. A desvantagem do etil lactato é sua alta absorção na região UV abaixo de 270 nm e sua viscosidade elevada (JUDGE; AAB, 2013).

7. ABORDAGEM ECOLÓGICA: RECICLAGEM DE SOLVENTES

Os resíduos gerados em RP-HPLC geralmente contêm acetonitrila, metanol ou isopropanol misturados com baixas concentrações de analitos, ácidos ou bases, os quais são prejudiciais ao meio ambiente e tóxico para os seres humanos. O descarte geralmente requer incineração, que consome muita energia e contribui para as emissões de gases de efeito estufa (OPPELT, 1987).

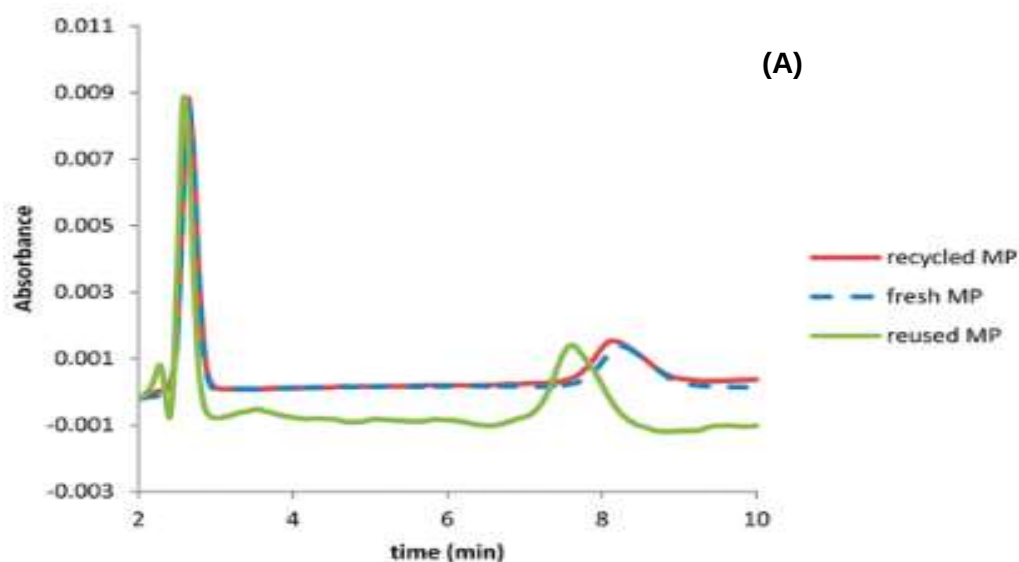
A reciclagem de solventes além de ser vista como uma abordagem para descontaminação de resíduos de RP-HPLC também é uma estratégia para tornar os métodos analíticos mais verdes possibilitando a economia de solventes orgânicos ao serem reutilizados como fase móvel (MOHAMED, 2015).

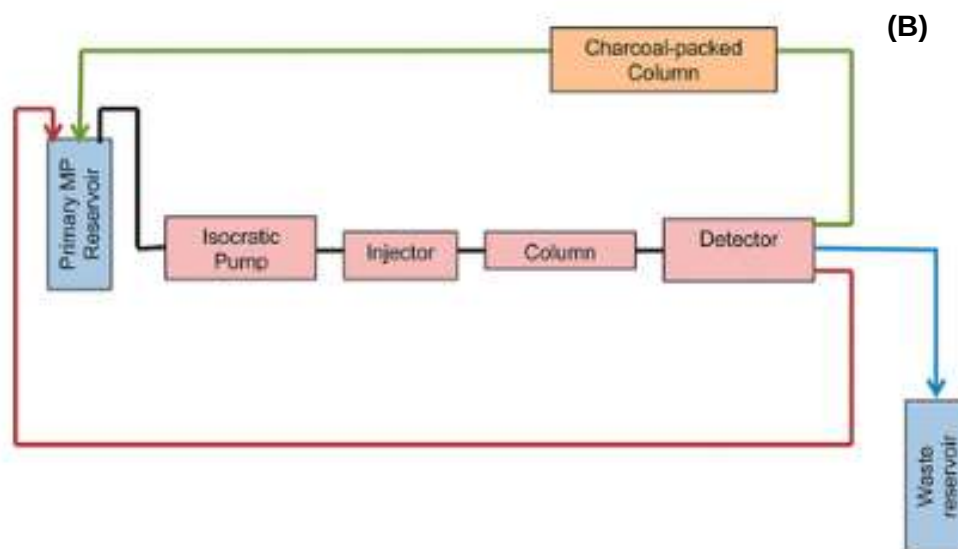
A reutilização dos resíduos de solventes orgânica como fase móvel não é oficialmente tolerada, visto que pode ocorrer o acúmulo progressivo de analito de absorção de UV e, conseqüentemente, o aumento da absorbância, o que acarreta

resultados quantitativos e qualitativos enviesados. No entanto, existem diferentes estratégias inovadoras para a reciclagem de solventes que podem reverter o problema do acúmulo de analito (ABREU; LAWRENCE, 2000).

No sistema de reciclagem de eluentes em circuito fechado, a recirculação da fase móvel para o reservatório do solvente ocorre após a remoção dos constituintes da amostra por adsorção em carvão ativado (Fig.27). Giaquinto e Samide (2013) descreveram o estudo de uso de uma coluna preenchida com carvão para remover o analito da fase móvel após a detecção, de modo que a fase móvel limpa possa ser recirculada e usada em processo de loop contínuo.

Figura 27 - (A) Comparação de cromatogramas para a separação de acetaminofeno e cafeína usando fase móvel fresca (azul) e fase móvel reciclada através da coluna com carvão (vermelha) e fase móvel reutilizada (verde). **(B)** Sistema de HPLC de bomba única mostrando a análise usando fase móvel fresca (caminho azul), fase móvel reciclada por meio de uma coluna cheia de carvão (caminho verde) e fase móvel reutilizada sem limpeza (caminho vermelho).





Fonte: GIAQUINTO; SAMIDE, 2013.

Figura 27 ilustra a comparação de cromatogramas para a separação de acetaminofeno e cafeína usando fase móvel fresca (linha azul), fase móvel reciclada (linha vermelha) e fase móvel reutilizada (linha verde). O cromatograma obtido usando a fase móvel fresca foi quase idêntico ao obtido usando a fase móvel que foi reciclada através da coluna de carvão em termos de retenção relativa e quantificação de pico. Isso demonstra que após a separação e detecção, o analito foi removido pela coluna de carvão. O estudo conclui que ao empregar essa técnica o uso da fase móvel foi reduzido em aproximadamente 80% (GIAQUINTO; SAMIDE, 2013).

Outra forma de reduzir significativamente o consumo da fase móvel é a reciclagem automatizada da fase móvel utilizando a técnica de destilação do solvente orgânico por destilação simples, destilação fracionada e evaporadores de película fina. No entanto a dificuldade desse método ocorre para fase móvel contendo acetonitrila misturada com água e/ou com metanol, pois ocorre a formação de azeótropo acetonitrila-água, o qual tem temperatura de ebulição muito próximo da acetonitrila pura (GODBOLE, 2005; OIANO, 2011; PACHECO, 2009; MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

O método de congelamento é o mais apropriado para a eliminação do azeótropo apesar de não ser uma alternativa rápida, no entanto é obtido acetonitrila com grau de pureza de 94,75%. Bezerra (2019) relatou em seu estudo que o custo

médio para a recuperação de um litro de acetonitrila com maior grau de pureza foi de R \$67,29. Este valor encontra-se abaixo do preço do litro da acetonitrila pura, que pode variar de R\$500,00 a R\$ 1.500,00 (BEZERRA, 2019)

8. CONCLUSÃO

A implementação dos princípios da Química Analítica Verde nos laboratórios analíticos tornou-se de grande interesse. Visto que, milhares de equipamentos de HPLC geram altas quantidades de solventes orgânicos e resíduos diariamente nas indústrias químicas e farmacêuticas. Esverdear as separações cromatográficas líquidas visando à redução do consumo de solventes orgânicos e, consequentemente, a produção de resíduos é um tema que vem sendo explorado cada vez mais.

Nesta revisão, foram abordadas muitas alternativas diferentes para esverdeamento de métodos analíticos convencionais. Uma boa estratégia para tornar os métodos de RP-HPLC mais ecológicos é a substituição dos solventes tóxicos como acetonitrila e metanol, usados com alta frequência, por solventes alternativos mais benignos. O uso de etanol como solvente verde na fase móvel se mostrou promissor, uma vez que é econômico e segue um desenvolvimento clássico de RP-HPLC, embora suas propriedades de viscosidade contribuam para aumentar a contrapressão na coluna, as quais podem ser solucionadas elevando a temperatura do sistema. Fases móveis totalmente aquosas em altas temperaturas ou a utilização de fluido supercrítico de CO₂ também são abordagens interessantes. Uma outra estratégia para o desenvolvimento de métodos analíticos *eco friendly* é a redução do consumo de solventes orgânicos implementando fases estacionárias modernas que proporcionem tempos de análise mais curtos e com redução de geração de resíduo. O uso de partículas *Core-Shell* com instrumentos HPLC ou totalmente porosas sub-2 µm com instrumentos UHPLC possibilitando análises rápidas com menos consumo de solventes orgânicos.

As várias estratégias apresentadas destacam que os métodos analíticos verdes de RP-HPLC podem ser utilizados com sucesso sem grandes impactos em termos de desempenho cromatográfico. Além do mais, a maioria das técnicas abordadas são econômicas, reduzem os gastos com descarte de resíduos e não necessitam de equipamentos caros. Assim, a substituição das metodologias analíticas existentes

por outras ecológicas e mais desenvolvimentos em direção à ecologização são esperadas nos próximos anos.

9. REFERÊNCIAS

- [1].ABREU, O; LAWRENCE, G D. Analytical reliability of mobile-phase recycling in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 72, no. 8, p. 1749–1753, 2000.
- [2].AFSHAR *et al.* An Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Permethrin Isomers: Application to Pharmaceutical Analysis, 2013.
- [3].ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010
- [4].ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in analytical chemistry**: TRAC, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008
- [5].ASSASSI, A. L.; ROY, C.; PEROVITCH, P., *et al.* Green analytical method development for statin analysis. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1380, p. 104–111, 2015.
- [6].BEZERRA, R. Recuperação de solvente (acetonitrila) por métodos de destilação.pdf . Trabalho de Conclusão de Curso, **UEA**, 2019.
- [7].CABRERA, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. **Journal of Separation Science**, vol. 27, no. 10–11, p. 843–852, 2004.
- [8].CHEN, S.; KORD, A. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1216, no. 34, p. 6204–6209, 2009.

- [9].CLARK, J. H.; TAVENER, S. J. Alternative solvents: shades of green. **Organic process research & development**, vol. 11, no. 1, p. 149–155, 2007.
- [10].DESTEFANO, J. J.; SCHUSTER, S. A.; LAWHORN, J. M., *et al.* Performance characteristics of new superficially porous particles. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1258, p. 76–83, 2012.
- [11].ELZANFALY, E. S.; HEGAZY, M. A.; SAAD, S. S., *et al.* Validated green high-performance liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: a comparison with reported conventional methods. **Journal of Separation Science**, vol. 38, no. 5, p. 757–763, 2015.
- [12].FEKETE, S.; OLÁH, E.; FEKETE, J. Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1228, p. 57–71, 2012.
- [13].FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; KHANDAGALE, M. M., *et al.* Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Separation Science**, vol. 38, no. 9, p. 1458–1465, 2015.
- [14].FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; KHANDAGALE, M. M., *et al.* Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Separation Science**, vol. 38, no. 9, p. 1458–1465, 2015.
- [15].GAŁUSZKA, A. *et al.* Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends in analytical chemistry**: TRAC, v. 37, p. 61–72, 2012.
- [16].GIAQUINTO, J. R.; SAMIDE, M. J. Cleaning and recycling mobile phase for chromatographic separations. **ACS sustainable chemistry & engineering**, vol. 1, no. 10, p. 1225–1230, 2013.

[17].GODBOLE, S.P. Purification and recovery of acetonitrile from waste solvent acetonitrile.**The Standard Oil Company. US n.** 6843890-B1. Depósito: 23/07/1999. Concessão: 18/01/2005.

[18].GRAND-GUILLAUME PERRENOUD, A.; VEUTHEY, J.; GUILLARME, D. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1266, p. 158–167, 2012.

[19].GREIBROKK, T.; ANDERSEN, T. High-temperature liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1000, no. 1–2, p. 743–755, 2003.

[20].GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, S. *et al.* New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 397, no. 3, p. 1069–1082, 2010.

[21].HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M. Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 27, no. 1, p. 1–14, 2008.

[22].HASAN M,SCHUMACHER G *et al.* LC-MS/MS method for the determination of clodronate in human plasma. **J Pharm Biomed.** 2014; 100:341–7.

[23].HEINISCH, S.; ROCCA, J. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, vol. 1216, no. 4, p. 642–658, 2009.

[24].JUDGE, M. D.; AAB, C. Ethyl lactate as an environmentally friendly HPLC mobile-phase modifier in the analysis of acetaminophen, caffeine, and ASA. **Canadian journal of chemistry**, vol. 91, no. 5, p. 352–356, 2013.

- [25].KLERCK, K.; MANGELINGS, D.; VANDER HEYDEN, Y. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 69, p. 77–92, 2012.
- [26].KOPPALA S,PANIGRAHI B, et al. Development and validation of a simple, sensitive, selective and stability-indicating RP-UPLC Method for the quantitative determination of ritonavir and its related compounds. **J Chromatogr Sci**. 2015.
- [27].KORANY, M. A. et al. Green chemistry: Analytical and chromatography. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 40, n. 16, p. 839–852, 2017.
- [28].LA GUARDIA, D.; GARRIGUES, S. (EDS.). **Handbook of green analytical chemistry**. 1. ed. [s.l.] Standards Information Network, 2012.
- [29].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.
- [30].MOHAMED, Heba M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 66, p. 176–192, 2015.
- [31].MOHAMED.H M., Lamie N. T. Analytical eco-scale for assessing the greenness of a developed RP-HPLC method used for simultaneous analysis of combined antihypertensive medications. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. 2016;99(5):1260–1265. doi: 10.5740/jaoacint.16-0124.
- [32].MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Basic Information Regarding the HPLC Techniques. Em: MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. (Eds.). **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2017b. p. 87–18.

[33].MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Solvents, buffers, and additives used in the mobile phase. Em: MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. (Eds.). **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 393–450.

[34].NIKOLIN, B.; IMAMOVIĆ, B.; MEDANHODZIĆ-VUK, S. et al. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, vol. 4, no. 2, p. 5–9, 2004.

[35].OLIVES, A. I.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; MARTÍN, M. A. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. **ACS sustainable chemistry & engineering**, vol. 5, no. 7, p. 5618–5634, 2017.

[36].OPPELT, E T. Incineration of hazardous waste. A critical review. **JAPCA**, vol. 37, no. 5, p. 558–586, 1987.

[37].PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J.. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. **Green Chemistry**, vol. 17, no. 7, p. 3687–3705, 2015.

[38].PETERSSON, P.; EUERBY, M. R. Characterisation of RPLC columns packed with porous sub-2 microm particles. **Journal of Separation Science**, vol. 30, no. 13, p. 2012–2024, 2007.

[39].PŁOTKA, J.; TOBISZEWSKI, M.; SULEJ, A. M., *et al.* Green chromatography. **Journal of Chromatography. A**, 2013.

[40].PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.

[41].RIBEIRO, Ricardo L. V.; BOTTOLI, Carla B. G.; COLLINS, Kenneth E.; *et al.* Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 15, no. 2, p. 300–306, 2004.

[42].ROJANARATA T. Eco-friendly, operator-safe and cost-effective RP-HPLC method for stability-indicating assay of prednisolone tablets using ethanol-water as mobile phase. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012;4:444–448.

[43].SADEGHI F.; NAVIDPOUR L., BAYAT S., AFSHAR M. Validation and Uncertainty Estimation of an Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Diltiazem in Pharmaceutical Preparations. *J. Anal. Methods Chem.* 2013:1–10. doi: 10.1155/2013/353814.

[44].SARKER, S. D.; NAHAR, L. Applications of high performance liquid chromatography in the analysis of herbal products. Em: MUKHERJEE, P. K. (Ed.). **Evidence-Based Validation of Herbal Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 405–425

[45].SHAABAN H,GÓRECKI T.. Optimization and validation of a fast ultrahigh-pressure liquid chromatographic method for simultaneous determination of selected sulphonamides in water samples using a fully porous sub-2 μm column at elevated temperature. *J Sep Sci.* 2012.

[46].SHAABAN TG.. High temperature–high efficiency liquid chromatography using sub-2 μm coupled columns for the analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and veterinary antibiotics in environmental samples. *Anal Chim Acta.* 2011.

[47].SHAABAN, H.; GÓRECKI, T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta*, vol. 132, p. 739–752, 2015.

[48].SHAABAN, Heba. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 25, p. 6929–6944, 2016.

[49].SHEN, Y.; CHEN, B.; VAN BEEK, T. A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green chemistry: an international journal and green chemistry resource**: GC, v. 17, n. 7, p. 4073–4081, 2015

[50].SHEN, Y.; CHEN, B.; VAN BEEK, T. A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green Chemistry**, vol. 17, no. 7, p. 4073–4081, 2015

[51].SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; JOHN, W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography** Por Lloyd R. [s.d.], 2009.

[52].TEUTENBERG, T; LERCH, O; GÖTZE, H J; *et al.* Separation of selected anticancer drugs using superheated water as the mobile phase. **Analytical Chemistry**, vol. 73, no. 16, p. 3896–3899, 2001.

[53].THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP-24, NF-19, Rockville, MD: **UnitedStates Pharmacopeial Convention**, 2000. p. 2149-2151.

[54].TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, vol. 5, p. 1–4, 2017.

[55].TÓTOLI E.G., SALGADO H.R.N. Development and validation of an economic, environmental friendly and stability-indicating analytical method for determination of ampicillin sodium for injection by RP-HPLC. **World J. Pharm. Sci.** 2014;3:1928–1943

[56].TÓTOLI E.G., SALGADO H.R.N. Development, Optimization, and Validation of a Green and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Daptomycin in Lyophilized Powder. **J. AOAC Int.** 2015;98:1276–1285. doi: 10.5740/jaoacint.15-039.

[57].WELCH, C. J.; BRKOVIC, T.; SCHAFER, W, *et al.* Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. **Green Chemistry**, vol. 11, no. 8, p. 1232, 2009.

[58] WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M. *et al.* Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 29, no. 7, p. 667–680, 2010.

[59] WU, N; LIPPERT, J. A.; LEE, M L. Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, vol. 911, no. 1, p. 1–12, 2001.

[60] YABRÉ, M.; FERREY, L.; SOMÉ, I. T. *et al.* Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 23, no. 5, 2018.

[61] YANG, Yu; BELGHAZI, M.; LAGADEC, A. *et al.* Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water. **Journal of Chromatography A**, vol. 810, no. 1–2, p. 149–159, 1998

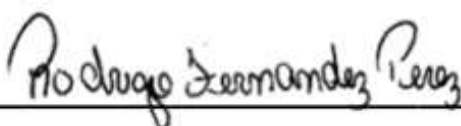
[62] YEHA, A. M.; MOHAMED, M. Green approach using monolithic column for simultaneous determination of coformulated drugs. **Journal of Separation Science**, vol. 39, no. 11, p. 2114–2122, 2016.

[63] ZACHARIS, C. K. Accelerating the quality control of pharmaceuticals using monolithic stationary phases: a review of recent HPLC applications. **Journal of chromatographic science**, vol. 47, no. 6, p. 443–451, 2009

[64] ZOU, W; DORSEY, J G; CHESTER, T L. Modifier effects on column efficiency in packed-column supercritical fluid chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 72, no. 15, p. 3620–3626, 2000.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como exigência para obtenção de título de bacharel em Farmácia-Bioquímica.



RODRIGO FERNANDEZ PEREZ



Dr. PAULO VICTOR CUESTA CALVO

São Paulo

2023