A RBF é uma publicação da ABF

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF)
BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY (BJP)
www.rbfarma.org.br

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW

Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada

Comparative merits of conventional and miniaturized High Performance Liquid Chromatography

Recebido em 12/01/2010

Aceito em 14/02/2011

Nayane Magalhães Nogueira[1], Brunna Thye Miyamoto Soares[1], Andréia Barbosa Navarro de Andrade[1], Anil Kumar Singh[2] *

[1] Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP, Brasil
[2] Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação com finalidade qualitativa e quantitativa que apresenta boa sensibilidade e permite a separação de substâncias químicas e farmacêuticas, muito utilizada na indústria farmacêutica, laboratórios de pesquisa e em outros campos da ciência como na medicina e em análises ambientais. Nos anos recentes, diferentes fabricantes adaptaram equipamentos que permitiram a miniaturização da técnica com o desenvolvimento de instrumentação adequada e melhoramento do sistema de controle de dados. Esses equipamentos foram denominados "cromatografia em fase líquida de ultra eficiência" (CLUE). O presente trabalho teve como objetivo apresentar os méritos dos métodos de CLAE e CLUE que demonstrassem, através dos resultados de análises realizadas em ambos os métodos, as principais diferenças entre eles e a possibilidade de transferência de tecnologia. A revisão demonstrou aspectos importantes de ambas as técnicas revelando que a CLUE consiste em uma evolução tecnológica da CLAE, permitindo importante otimização em termos de resolução e sensibilidade. Os dados obtidos neste levantamento sugerem que a CLUE pode apresentar melhor relação custo-benefício a médio ou longo prazos, além da possibilidade de minimizar o impacto ambiental e ocupacional decorrente do uso de solventes e outras substâncias.

Palavras-chave: CLAE, CLUE, Escala convencional, Escala miniaturizada, Estudo comparativo dos méritos

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is an efficient separation technique for quantitative and qualitative analysis of chemical and pharmaceutical substances. Widely used in the pharmaceutical industry, research laboratories and other fields of science, such as medicine and environmental sample analysis. In recent years, several manufacturers adapted equipment that allowed the miniaturization of technology through the development of adequate instruments and improvement in data collection and analysis. These equipments are often called "Ultra Performance Liquid Chromatography" (UPLC). This paper aimed at evaluation of merits of HPLC and UPLC methods and to demonstrate using the literature results, the main differences between them and the possibility of technology transfer. This review shows the most important aspects of both techniques, demonstrating that the UPLC consists of a technological evolution of the HPLC, allowing a significant optimization in terms of resolution and sensitivity. The data in this review suggest that UPLC can prove to be more cost effective in medium to long term, besides the possibility of minimizing the impact on environmental and occupational health due to use of solvents and other substances.

Keywords: HPLC, UPLC, Conventional Scale, Miniaturized Scale, Comparative Study of Merits

* **Contato:** Anil Kumar Singh, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Caixa postal 66355, CEP: 05389-970, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: anil@usp.br

INTRODUÇÃO

A cromatografia pode ser considerada um método físico-químico de separação por conter uma fase móvel e uma estacionária, sendo que a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da estacionária. Outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatograma, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito (Ciola, 1985; Jin *et al*., 2008).

De acordo com Tonhi e coautores (2002), os sistemas de cromatografia em fase líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, apresenta diversas vantagens por permitir o uso de solventes relativamente menos tóxicos e de menor custo, como metanol e água. Entre os méritos mais importantes do CLAE-FR incluem disponibilidade das fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes, rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel, facilidade de empregar eluição por gradiente, maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade das respostas. Enquanto a CLAE em fase normal têm as polaridades invertidas, o que permite a separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

Nos anos recentes, a miniaturização da técnica de CLAE tornou-se possível, com o desenvolvimento da instrumentação (bombas, injetores e detectores) resistente às altas pressões e com volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados. As colunas cromatográficas também foram preparadas para resistir a altas pressões e com baixo volume morto e injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (Maldaner & Jardim, 2009; Wren, 2005).

A possibilidade de transferência de um método já desenvolvido e validado empregando um sistema CLAE convencional para um sistema miniaturizado é um aspecto muito importante a ser considerado, pois, muitas vezes, tem-se constituído no fator limitante para difusão e uso do sistema miniaturizado. A transferência de um método já desenvolvido para outro é totalmente passível desde que os fatores como o modo de eluição empregado seja considerado (Jerkovih *et al.*, 2005).

Histórico

A cromatografia em fase líquida teve início em 1950 e alcançou muitos avanços até os dias de hoje. Nos últimos 40 anos, foi à técnica analítica que mais se desenvolveu e é uma das mais empregadas nas indústrias farmacêuticas (Tonhi *et al.*, 2002). Seu desenvolvimento contínuo buscou inovações tecnológicas de forma a modificar a fase estacionária deixando-a mais seletiva, eficiente e quimicamente e fisicamente mais estável como novas partículas para empacotamento com diâmetros menores e formas regulares (Tonhi *et al.*, 2002).

As inovações proporcionaram melhor desempenho cromatográfico, maior reprodutibilidade e análises mais rápidas sem perda de eficiência e da resolução (Majors, 2005; Wu & Thompson, 2006).

Para isso, a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas foi à alternativa mais explorada, porém ficou limitada por um período por causa da elevada pressão resultante desta concomitante redução, que não é compatível com os sistemas cromatográficos convencionais. Entretanto, o uso de colunas empacotadas com partículas de diâmetro sub-2µm se tornou possível recentemente, com o desenvolvimento da cromatografia em fase líquida miniaturizado, que oferece vantagens sobre as colunas tradicionais com partículas de 3 e 5µm, com menor tempo de análise (tR), maior resolução (Rs) e maior fator de capacidade de sinais (α) (Majors, 2005).

Em tempos atuais há necessidade de aumentar a eficiência analítica. A CLAE em escala miniaturizada tem demonstrado ser uma técnica promissora neste sentido. Na atualidade há interesse considerável dos fabricantes dos equipamentos analíticos no desenvolvimento de instrumentação e acessórios que suportam pressões elevadas, as quais oferecem benefícios na rotina de análise, como sinais com maior eficiência, tempos de retenção menores e utilização de menor quantidade de solventes (Rainville & Plumb, 2007; Wren & Tchelitcheff, 2006).

Comparação entre os métodos CLAE E CLUE

O CLAE miniaturizado, denominado Cromatografia em fase Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) é uma nova tecnologia para proporcionar a máxima eficiência cromatográfica das partículas porosas sub - 2µm e, com isso, ganho em resolução, sensibilidade, tempo de retenção, velocidade linear, largura e eficiência nos sinais, permitindo assim uma análise mais rápida e com um gasto de solventes e amostra menores entre as análises quando comparadas com a CLAE que utiliza partículas convencionas de 10 µm, 5 µm ou 3,5 µm (Jerkovih, *et al.*, 2005; Rainville & Plumb, 2007; Wren, 2005; Wren & Tchelitcheff, 2006).

A transferência de um método com coluna convencional para coluna com partículas de diâmetro sub-2µm pode levar em conta as diferentes necessidades analíticas. Se as dimensões da coluna são mantidas e somente o tamanho da partícula é reduzido, melhorias na eficiência, na resolução e na capacidade de sinais são obtidas. Se, além da redução no tamanho da partícula, as dimensões da coluna também forem reduzidas, o tempo de análise também será menor. A Tabela 1 apresenta uma relação entre queda de pressão na coluna (ΔP), tempo de retenção (tR), de acordo com as mudanças no tamanho de partículas (dp), e comprimento da coluna (L). Em ambos os casos, a vazão, o perfil do gradiente e o volume de amostra injetado devem ser ajustados adequadamente (Jin *et al.*, 2008).

A base dessa evolução é governada pela equação de Van Deemter, que descreve a relação entre eficiência, expressa

pela altura de pratos teóricos (H, µm), velocidade linear da fase móvel (µ, mm/s) e tamanho da partícula (dp):

$$H = Ad_p + \frac{BD_M}{\mu} + \frac{CD_p^2\mu}{D_M}$$

Onde D_M = coeficiente de difusão do analito, µ = velocidade linear da fase móvel (mm/s), dp = tamanho da partícula e A, B e C são constantes (Maldaner & Jardim, 2009).

Tabela 1. **Variação de pressão na coluna (ΔP) e tempo de retenção (tR), de acordo com as mudanças no tamanho de partículas (dp), e comprimento da coluna (L)** (Jin *et al.*, 2008)**.**

Tamanho de partículas (dp, µm)	Comprimento (L, cm)	Queda de pressão (ΔP, psi)	Tempo de retenção (tR, min)
10	25	1.000	10
5	12,5	2.000	5
2	5	5.000	2

O termo A refere-se ao alargamento dos sinais, devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. Esse termo pode ser minimizado usando-se colunas de tamanho reduzido, com diâmetros internos menores, sem empacotamentos eficientes e partículas uniformes. O termo B está relacionado à difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de altas velocidades lineares da fase móvel. O termo C descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária (Maldaner & Jardim, 2009; Nováková *et al.*, 2006).

O mínimo da curva de Van Deemter representa a vazão ótima para se obter a eficiência máxima da coluna. Isto é um compromisso entre os termos B e C. Os termos A e C são influenciados pelo tamanho das partículas. As partículas menores tendem a reduzir a altura do prato (H) e, dessa forma, são obtidas colunas com um número de pratos maior, ou seja, mais eficientes. As partículas pequenas tendem a permitir trocas do soluto na fase móvel e nos poros das partículas mais rapidamente devido a menor profundidade dos poros. Assim, o soluto gasta um tempo menor entre a fase móvel e a fase estacionária, eluindo em sinais estreitos (Jerkovih *et al.*, 2005).

Uma vantagem do uso de partículas menores que 2 µm é que a eficiência da coluna pode ser mantida com a diminuição do seu comprimento (Figura 1). Uma coluna menor permite separações rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna. Além disso, uma coluna menor, comparada a uma maior, empregando-se a mesma vazão de fase móvel, gastando uma menor quantidade de solvente, de amostra e de fase estacionária (Wren, 2005).

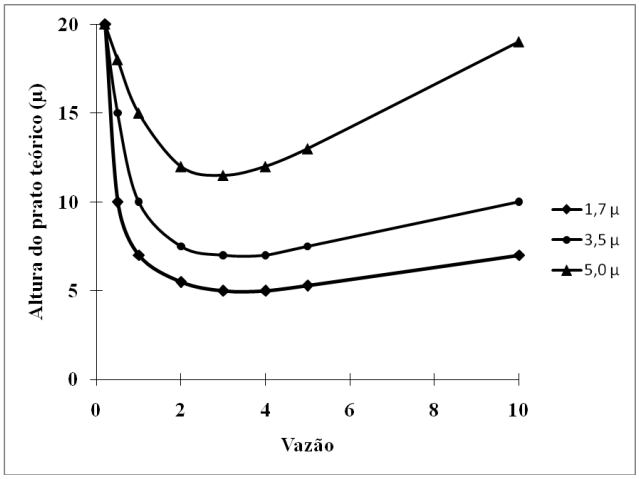

Figura 1. O efeito de tamanho da sílica (dp) sobre a altura do prato teórico (H) em função da vazão da fase móvel (com adaptações) (Wren, 2005).

No caso de eluição isocrática, o principal fator a ser considerado é o volume extra-coluna (do injetor, da cela do detector e das tubulações), que provoca alargamento dos sinais cromatográficos quando não existe compatibilidade entre o volume extra-coluna do equipamento com o diâmetro da coluna. Nesse caso, uma boa separação depende da razão entre o volume extra-coluna e o volume total (coluna/extra-coluna) que deve ser sempre menor que 10% em ambos os sistemas, CLAE e CLUE. Além disso, a fase estacionária deve ser similar à do método já existente. Deve-se otimizar o volume de injeção e a vazão da fase móvel, que podem ser calculados pelas equações a seguir (Maldaner & Jardim, 2009):

$$V_{inj\,2} = V_{inj\,1} \times \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}^2} \times \frac{L_2}{L_1}$$

Onde, Vinj2 = volume de injeção a ser determinado; Vinj1 = volume de injeção do método desenvolvido; dc_2 = diâmetro interno da coluna a ser empregada; dc_1 = diâmetro interno da coluna empregada no método desenvolvido; L_2 = comprimento da coluna a ser empregada; L_1 = comprimento da coluna empregada no método desenvolvido.

$$F_2 = F_1 \times \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}} \times \frac{d_{p_1}}{d_{p_2}}$$

Onde, F_2 = vazão da fase móvel a ser determinada; F_1 = vazão da fase móvel do método desenvolvido; dp_1 = diâmetro da partícula de fase estacionária empregada no método desenvolvido; dp_2 = diâmetro da partícula de fase estacionária a ser empregada.

Para eluição das substâncias, por gradiente, deve ser levado em consideração o tempo de residência da fase móvel que resulta em variações nos tempos de retenção, comprometendo a resolução, sobretudo das primeiras substâncias eluídas quando não existe compatibilidade entre o tempo de residência da fase móvel com o diâmetro da coluna. Com isso, a transferência do método só é válida

quando a razão entre o tempo de retardamento da fase móvel é constante. Além disso, a fase estacionária deve ser similar à usada no método já existente e a composição inicial e final do gradiente deve permanecer constante.

Parâmetros como volume de injeção, vazão da fase móvel, tempo da etapa isocrática do gradiente e tempo de gradiente devem ser otimizados e podem ser calculados as seguinte forma, respectivamente (Maldaner & Jardim, 2009):

$$t_{iso_2} = t_{iso_1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{V_{m_2}}{V_{m_1}}$$

Onde, $tiso_1$ = tempo da etapa isocrática do gradiente 1, $tiso_2$ = tempo da etapa isocrática do gradiente 2, F_1 = vazão da fase móvel 1; F_2 = vazão da fase móvel 2; Vm_2 = volume de retardamento da fase móvel a ser empregado; Vm_1 = volume de retardamento da fase móvel empregado no método desenvolvido.

$$t_{grad2} = \frac{(\%B_{final_1} - \%B_{inicial_1})}{slope_2}$$

Onde, $tgrad_2$ = tempo da etapa do gradiente 2; %B = porcentagem de solvente orgânico; Slope = inclinação da rampa do gradiente 2.

$$Slope_2 = slope_1 \; x \; \frac{V_{m_1}}{V_{m_2}} \; x \; \frac{F_2}{F_1}$$

Miniaturização e Geração de Resíduos Orgânicos

Os laboratórios que geram resíduos químicos na sua rotina (Equipamento de CLAE), a minimização (Equipamento de CLUE) resulta em atitudes, que, quando implementadas e seguidas corretamente, poderão certamente reduzir a produção de resíduos e reduzir o potencial de impacto no meio ambiente (Jardim, 1998). Estas duas atitudes são: 1-) Mudança de escala convencional para a miniaturização e 2) Substituição de reagentes e mudanças nos procedimentos.

Estas duas atitudes, geralmente, não requerem custo exagerado (em curto prazo o aspecto econômico é pago pela economia gerada no consumo de reagentes bem como no tratamento e disposição final desses resíduos) e são facilmente assimiladas pelos colaboradores. (Borges *et al.*, 2004; Jardim, 1993).

A opção pela miniaturização diante à escala tradicional, está centrada em algumas vantagens, discutidas a seguir:

Economia de tempo

Tendo em vista que os volumes usados são menores, o tempo gasto nas análises são bem menores. Além disso, pequenos volumes demandam um período de tempo muito mais rápido quando precedem a instrumentação analítica (Jerkovih *et al.*, 2005; Majors, 2005; Nováková *et al.*, 2006; Pereira, 2008).

Economia financeira

A grande maioria dos ensaios usados nas rotinas laboratoriais foi desenvolvida há pelo menos uma década (e alguns há mais de 50 anos), e adotam a escala convencional. Na escala miniaturizada, no entanto, raramente se usa grandes quantidades, o que representa uma ampla economia em termos de solventes e energia usada pelos equipamentos. Nos tempos atuais, além de existir ainda a preocupação com a disponibilidade da acetonitrila (ACN), o solvente orgânico mais utilizado atualmente nas cromatografias, CLAE e/ou CLUE, que foi drasticamente reduzida, enquanto seu preço chegou às alturas exagerados (Lanças, 2009; Pereira, 2008).

Devido à denominada "crise" desse solvente, a busca por novas alternativas para minimizar, substituir, ou eliminar o uso de ACN tem sido grande, e uma das alternativas sugeridas no combate à escassez desse solvente é a miniaturização da coluna cromatográfica: diminuição do diâmetro interno da coluna (micro-CLAE) ou nano-CLAE) com imensa economia de solvente e no comprimento do tubo com conseqüente diminuição no diâmetro médio das partículas. Essa opção permite uma economia menor de fase móvel e uma economia de tempo de análise maior (Lanças, 2009).

Sendo assim, os usuários de ACN como fase móvel na cromatografia devem ficar atentos para o fato de o custo estar se elevando e a disponibilidade desse solvente estar diminuindo, devendo cogitar possíveis alternativas para a utilização de outros solventes ou pela miniaturização do processo (Lanças, 2009).

Como foi mencionado anteriormente, é importante ressaltar que a adaptação de um ensaio de escala convencional para a miniaturização irá exigir um novo protocolo de validação analítica.

Aspectos ambientais

Talvez o ponto mais importante da mudança da escala convencional para a adoção da miniaturização seja a formação de um profissional mais consciente das suas responsabilidades com a preservação ambiental (Geração de Resíduos) (Jardim, 1998; Nováková *et al.*, 2006).

Sendo assim, a adoção da miniaturização, a qual gera uma menor quantidade de resíduos do que a escalas convencionais, reduzem drasticamente a geração de resíduos nos laboratórios (Jardim, 1998; Nováková *et al.*, 2006).

Segurança

O manuseio de pequenas quantidades de reagentes agressivos e solventes voláteis torna o laboratório muito menos insalubre do que quando se trabalha com os grandes volumes, observados nos procedimentos convencionais. A adoção da miniaturização melhora a qualidade do ar respirável nos laboratórios e minimiza os riscos a saúde do colaborador (Intoxicação Ocupacional) (Jardim, 1998).

A Tabela 2 descreve uma classificação "ponderada" das colunas cromatográficas baseada no diâmetro interno das colunas comercializadas na atualidade. A vazão típica empregada, eventuais resíduos gerados com as colunas do tipo nano capilar destacam a importância e a necessidade da miniaturização da cromatografia em fase líquida (Maldaner & Jardim, 2009; Nováková *et al.*, 2006).

Tabela 2. Classificação das colunas baseada no diâmetro interno (d.i.) (Maldaner & Jardim, 2009; Nováková *et al.*, 2006).

Tipo da coluna*	Diâmetro interno típico* (mm)	Vazão típica empregada (ml /min)	Volume morto (ml) (L = 150 mm)	Capacidade de carregamento típico (µg)
Preparativa	> 25	> 30	> 50,0	> 30.000**
Semi-preparativa	10	5	7,5	5000**
Convencional	4,6 ou 4,0	1,0	1,6	100
Mini-bore	3,0	0,4	0,7	40
Narrobore	2,0	0,2	0,3	20
Microbore	1,0	0,05	0,075	5
Micro LC-Capilar	< 0,5	0,01	0,02	1
Nano LC-Capilar	< 0,1	0,0005	0,001	0,05

* Designações desses tipos de colunas não são universalmente aceites e podem variar de acordo com os fabricantes. d.i. típico da coluna. O volume morto é baseado em comprimentos de 150mm.** condições de sobrecarga.

ESTUDOS COMPARATIVOS DO CLAE E CLUE

A seguir estão apresentados alguns resultados de trabalhos de separações obtidas empregando a cromatografia em fase liquida em escala convencional e nos sistemas miniaturizado:

Separação Cromatográfica do Ibuprofeno

Pereira (2008) apresentou um estudo no qual comparou um método cromatográfico com outros dois métodos por CLUE aplicados na separação cromatográfica do Ibuprofeno. Os referidos métodos empregam uma detecção em comprimento de onda de 214nm e as separações foram obtidas em temperatura de 30°C. A fase móvel foi constituída de A= 0,05% ácido fosfórico em água: ACN (66: 34, v/v) e B = ACN. Para o sistema CLAE, o gradiente usado foi: 0-24,9 min. (0% de B); 25,0 – 54,9 min. (85% de B com gradiente linear); 55,0 – 70,0 min. (85% de B); 70,1 min. (0% de B).

Para o sistema CLUE A o gradiente usado foi: 0-6,0 min. (0% de B); 6,1 – 14,0 min. (85% de B com gradiente linear); 14,1 – 17,9 min. (85% de B); 18,0 min. (0% de B).

Para o sistema CLUE B o gradiente usado foi: 0-3,1 min. (0% de B); 3,2 – 7,0 min. (85% de B com gradiente linear); 7,1 – 8,9 min. (85% de B); 9,0 min. (0% de B).

Foram usadas três colunas, uma convencional (C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e duas em escala miniaturizada: CLUE A (C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm) e CLUE B (C18, 50 mm x 2,1 mm, 1,9 µm). A vazão da fase móvel foi de 1 ml/min. para CLAE e 0,55 ml/min. para CLUE A e CLUE B e o volume de injeção de 10 µl, 1,4 µl e 0,7 µl, respectivamente.

O tempo de retenção foi 35 min. para CLAE, 9,6 min. para CLUE A e 5 min. para CLUE B. Os resultados apresentados sugerem que a diminuição no comprimento, diâmetro interno da coluna e no tamanho de sílica da coluna levam a uma economia da fase móvel, da amostra e de tempo de análise, tornando o método mais rápido, barato e que não requer uma grande quantidade de amostra. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Consumo de tempo e solvente em análise de Ibuprofeno nas metodologias CLAE e CLUE (Pereira, 2008).

Parâmetros	CLAE	CLUE A	CLUE B
Tempo de corrida cromatográfica (min)	47	12,6	6,6
Economia de tempo	-	4 vezes	7 vezes
Solvente gasto por análise (ml)	47	6,93	3,63
Economia de solvente	-	4 vezes	13 vezes

Separação Cromatográfica da Sinvastatina

A separação cromatográfica de sinvastatina foi obtida com coluna convencional (CLAE) (C18, 250 mm x 4,6 mm, 5µm) e por duas colunas miniaturizadas, CLUE A (C18, 100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) e CLUE B (C18, 30 mm x 2.1 mm x 1,7 µm). Os referidos métodos empregaram uma detecção em comprimento de onda de 238nm e as separações foram obtidas em temperatura de 45°C (Rainville & Plumb, 2007). A fase móvel foi constituído de ACN: tampão fosfato, pH 4,5; (65:35, v/v) para CLAE e para CLUE A e CLUE B manteve ACN:H20 (65:35, v/v). A vazão da fase móvel foi de 1,5 ml/min. para CLAE e 0,56 ml/min. para CLUE A e CLUE B e o volume de injeção de 10 µl para CLAE e 0,8µl para os métodos CLUE. O tempo de retenção foi 9,28, 1,92 e 0,23 min. para CLAE, CLUE A e CLUE B, respectivamente.

Os resultados demonstraram diferenças significativas tanto em quantidade de fase móveis gasto e diminuição do tempo de retenção que podem ser observados na Tabela 4, bem como uma diminuição na quantidade de amostra requerida.

Cabe notar que uma modificação na composição da fase móvel foi necessária para obter eluições mais rápidas no caso de CLUE. Isso sugere que tanto o comprimento e o diâmetro interno da coluna quanto o tamanho da sílica interferem nas interações retentivas destas colunas. Assim, devidos cuidados devem ser tomados durante as transposições de um método desenvolvido em escala convencional para escala miniaturizada.

Tabela 4. Consumo de tempo e solvente em análise de Sinvastatina nas metodologias CLAE e CLUE (Rainville & Plumb, 2007).

Parâmetros	CLAE	CLUE A	CLUE B
Tempo de corrida cromatográfica (min)	10	2,2	0,4
Economia de tempo	-	5 vezes	25 vezes
Solvente gasto por análise (ml)	14,4	1,04	1,04
Economia de solvente	-	12 vezes	67 vezes

Separação Cromatográfica da Loratadina

Recentemente, Majors (2005) apresentou uma comparação entre três métodos cromatográficos aplicados na separação de loratadina. A fase móvel foi constituída de solução 0,01M fosfato de potássio dibásico (pH 7,2): MeOH: ACN (36,8; 31,6; 31,6, v/v/v). A detecção foi realizada no comprimento de onda de 247nm e as análises foram realizadas em temperatura de 30°C. Diferentemente dos casos anteriores, onde os comprimentos das colunas eram diferentes, neste caso o comprimento da coluna foi diferente apenas no caso de CLAE (150 mm) contra 100 mm para CLUE A e CLUE B.

O diâmetro da coluna foi de 4,6 mm para todos os métodos. Entretanto, a coluna CLAE foi empacotada com sílica de 5µm e as colunas CLUE A e CLUE B com 3,5µm.

Uma vazão de 1 ml/min. foi empregada em todos os casos. Assim, pode-se perceber que a vazão pode ser mantida, quando o diâmetro interno da coluna é igual e, concomitantemente, não há grandes mudanças no tamanho da sílica empregada para empacotar as colunas. Por outro lado, houve uma redução no volume de injeção da amostra para evitar acesso de carga nessas colunas curtas. Neste caso, o volume de injeção foi de 15µl para CLAE, 10 µl CLUE A e 5µl para CLUE B. O tempo de retenção da loratadina foi de 13,0 min., 9,0 min. e 4,5 min., respectivamente.

Assim sendo, mesmo sem apresentar diferença na vazão, os resultados demonstrados de tempo de retenção e quantidade de amostra utilizada são melhores de acordo com a diminuição do comprimento da coluna e tamanho da partícula de empacotamento entre CLAE e CLUE, conforme demonstrado na Tabela 5.

Em todos os resultados apresentados e discutidos verifica-se que diferenças significativas se devem ao tamanho reduzido das partículas que leva a uma melhor eficiência e otimização da velocidade da fase móvel e da transferência de massa. Além disso, devido à menor profundidade dos poros da coluna, as trocas do soluto na fase móvel são mais rápidas e surgem sinais mais estreitos.

Pode-se observar, também, que a diminuição do comprimento da coluna não compromete sua eficiência, mas sim apresenta outras vantagens como a diminuição do tempo de separação, quantidade de solvente gasto, quantidade de amostra e de fase estacionária, visto que esses parâmetros são proporcionais ao tamanho da coluna.

Tabela 5. Consumo de tempo e solvente em análise de Loratadina nas metodologias CLAE e CLUE (Majors, 2005).

Parâmetros	CLAE	CLUE A	CLUE B
Tempo de corrida cromatográfica (min)	15	10	6
Economia de tempo	-	1,5 vezes	3 vezes
Solvente gasto por análise (ml)	15	10	6
Economia de solvente	-	1,7 vezes	3,0 vezes

CONCLUSÕES

A cromatografia em fase líquida de ultra-eficiência (CLUE) é uma técnica bastante recente, e já está sendo utilizada em análises de rotina em diversas áreas. Esta rápida difusão dessa técnica está relacionada, principalmente, à disponibilidade da instrumentação totalmente desenvolvida e adequada para as necessidades do emprego de partículas sub-2-µm e altas pressões, além de materiais de empacotamento, como as partículas híbridas, que possuem desempenho cromatográfico superior às partículas de sílica pura.

Com base nos resultados que estão sendo apresentados em diversos trabalhos realizados por pesquisadores que comparam os dois métodos, pode-se observar que, a maior parte das substâncias analisadas apresenta menor tempo de análise e de uso de solvente em quantidades reduzidas, quando as analises são realizadas em CLUE.

Apesar de todas estas vantagens, poucos estudos foram realizados para avaliar o tempo de vida das colunas que são submetidas a condições extremas de pressão e o custo de manutenção de um equipamento que possui uma série de particularidades e opera em altas pressões. Além disso, nos anos recentes houve desenvolvimento tecnológico das colunas cromatográficas, especificamente das colunas para o CLUE, que sejam capazes de gerar o máximo desempenho cromatográfico.

O cuidado para com o descarte de resíduos químicos oriundos de laboratórios de ensino e pesquisa é antes de tudo, um compromisso moral para com a sociedade. Um programa de gerenciamento de resíduos não é uma atividade que envolve apenas algumas pessoas da unidade geradora, mas deve ser sempre tratada como uma atividade cujo sucesso depende de todos. Ainda que nos dias de hoje

a componente financeira de qualquer empreendimento tenha assumido uma importância decisória, é importante lembrar que um programa deste tipo não pode ser analisado apenas sob esta ótica. No cenário aqui apresentado, a contabilidade ambiental mostra que qualquer programa de minimização de impacto ambiental se paga mesmo em curto prazo. Neste contexto, conclui-se que a miniaturização da técnica de cromatografia em fase líquida aplicada na análise das substâncias químicas e produtos farmacêuticos, seja em escala microlitros ou nanolitros, é um bom caminho para preservação ambiental em tempos atuais.

REFERÊNCIAS

Borges MS, Zamora PP, Kunz A. Gerenciamento de Resíduos de Laboratório: As Novas Tendências e a Sustentabilidade Ambiental. *In*: Congresso Brasileiro de ICTR 2004 - Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável & NISAN - Ciclo de Conferências sobre Política e Gestão Ambiental, 2004, Florianópolis. Resíduos: Resumo dos trabalhos apresentados no ICTR 2004 - Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável. NISAN 2004 - *Ciclo de Conferências sobre Política e Gestão Ambiental*. São Paulo: ICTR, 01: 102 - 102, 2004.

Ciola R. Fundamentos da cromatografia a gás. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1985. 266 p.

Jardim WF. Gerenciamento de resíduos químicos em laboratórios de ensino e pesquisa. *Quim. Nova*, 21: 671 - 673, 1998.

Jardim WF. As indústrias químicas e a preservação ambiental. *Rev. Quím. Ind.*, 692: 16 - 18, 1993.

Jerkovih AD, Lobrutto R, Vivilecchia RV. The use of acquity uplc in pharmaceutical development. *Sep. Sci. Redef.*, Maio: 15 - 21, 2005.

Jin Y, Xue X, Shi H, Xiao Y, Zhang F, Liang X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. *Mode. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.*, 10(1): 80 - 84, 2008.

Lanças FM. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? *Scientia Chromatographica*, 01: 51 - 60, 2009.

Majors RE. Fast and ultrafast HPLC on sub-2-µm porous particles – Where do we go from here? *LCGC North Am.*, 23: 1248 - 1255, 2005.

Maldaner L & Jardim ICSF. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. *Quim. Nova*, 32: 214 - 222, 2009.

Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68: 908 - 918, 2006.

Pereira L. Transferência de método HPLC para U-HPLC de maior resolução e rapidez. *Rev. Anal*, 34: 68 - 76, 2008.

Rainville P, Plumb R. Transfer of the USP Assay for Simvastatin to UPLC. *Ultraperformance LC*, Jun: 9 - 11, 2007.

Tonhi E, Collins KE, Jardim ICSF, Collins CH. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, (CLAE-RF) baseada em superfície de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quim. Nova*, 25: 616 - 623, 2002.

Wren SAC. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38: 337 - 343, 2005.

Wren SAC & Tchelitcheff P. Use of ultra-perfomance liquid chromatography in pharmaceutical development. *J. Chromatogr. A*, 1119: 140 - 146, 2006.

Wu N & Thompson R. Fast and efficient separations using reversed phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. & RT*, 29: 949 - 988, 2006.