

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)

Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”?

Fernando M. Lanças

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
13560-970 – São Carlos (SP)
flancas@iqsc.usp.br

Resumo

O solvente orgânico mais utilizado atualmente em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é a acetonitrila ou cianeto de metila. A partir de outubro de 2008, a disponibilidade deste solvente foi drasticamente reduzida, enquanto que seu preço elevou-se acima de patamares considerados aceitáveis para este tipo de solvente. Várias razões têm sido apontadas para explicar tais fatos, sendo as principais os problemas decorrentes do fechamento (ainda que temporário) de empresas Chinesas que purificam este solvente em larga escala, e a diminuição internacional da demanda de acrilonitrila, devido à denominada “crise”, durante cuja fabricação a acetonitrila é um dos subprodutos. Qualquer que seja a razão real para esta nova situação, o desafio para encontrar mecanismos para minimizar, substituir, ou eliminar o uso de acetonitrila tem sido grande e a busca imperativa. No presente trabalho são discutidas dez opções para otimizar/minimizar/eliminar o uso de acetonitrila em HPLC, alguns envolvendo simples mudanças na fase móvel até outras mais radicais que requerem mudanças profundas na instrumentação utilizada.

Palavras-chave

Acetonitrila, eluente, HPLC, otimização da fase móvel.

Abstract

Acetonitrile is nowadays by far the major organic solvent used as mobile phase in HPLC. Starting the second semester in 2008, the availability of this solvent decreased at the same time that its cost jumped to values considered well above reasonable for this kind of solvent. Several explanations has been invoked to explain this new situation . The most accepted ones the closing of Chinese large acetonitrile purification units, and the actual international financial “crisis” which lowered the demand for the production of acrilonitrile, of whose fabrication acetonitrile is a by-product. Independently of the reason, the new situation demands the search for alternatives to decrease or even eliminate the use of this solvent in HPLC. In the present work, we suggest 10 different ways to optimize/minimize/eliminate the use of acetonitrile in HPLC methods. Some methods requires just small changes, while some others demands larger instrument modification.

Keywords

Acetonitrile, eluent, HPLC, mobile phase optimization.

1. O problema

Acetonitrila, (Figura 1), comumente abreviada como ACN, é um líquido incolor à temperatura ambiente, de fórmula química CH_3CN , amplamente utilizado como solvente em várias áreas da química e suas múltiplas aplicações. ACN é um bom solvente, tendo um poder de dissolução razoavelmente bom, mas com ponto de ebulição relativamente baixo (82°C). Misturas contendo acetonitrila/água, nas mais diversas proporções, são amplamente utilizadas em química analítica, em especial nos métodos de separação, principalmente em cromatografia líquida em escalas analítica e preparativa. A cromatografia líquida em fase reversa é o modo mais empregado, sendo a fase móvel mais popular nesta modalidade de HPLC uma mistura acetonitrila:água, em diversas proporções.



Figura 1. Fórmula química (a) e modelo (b) da acetonitrila [nome IUPAC].

A acetonitrila é um subproduto da produção de acrilonitrila (Figura 2); apesar da ACN poder ser produzida a partir de outras rotas, estas não têm interesse comercial no presente.



Figura 2. Fórmula química (a) e modelo (b) da acrilonitrila [nome IUPAC: etenilnitrila].

Os quatro maiores produtores de acetonitrila nos Estados Unidos são a Ineos, Dupont, J.T. Baker e a Sterling Chemicals, as

quais distribuem o produto através de uma malha internacional.

A partir do segundo semestre de 2008, principalmente a partir de outubro, iniciou-se um processo de diminuição internacional da oferta de ACN. Existem várias possíveis explicações para o fato, sendo uma delas a diminuição de produção na China no ano de 2008 devido aos Jogos Olímpicos, assim como os danos causados a uma fábrica americana devido ao furacão Ike. Ninguém exclui também o fato de que a acetonitrila, sendo um subproduto da preparação de acrilonitrila, sofreu uma enorme queda de produção devido à diminuição da atividade econômica (recessão? crise?) em todo o mundo a partir desse mesmo período. Uma das principais aplicações da acrilonitrila é na produção de plásticos amplamente utilizados na indústria automobilística, dentre outras.

Independentemente da razão, ou do conjunto delas, é fato que a partir de outubro de 2008 houve uma diminuição drástica da oferta de acetonitrila em todo o mundo, acompanhada de um aumento brutal em seu custo. Existem registros de aumentos de até 10 vezes no preço do ACN quando se compara o primeiro semestre de 2008 com janeiro de 2009. Fato ainda mais grave é que as perspectivas para o ano 2009 são ainda menos animadoras, sem previsão de melhora do quadro a curto prazo. Algumas empresas internacionais de grande porte já começaram a racionar a venda de ACN¹ e, ainda assim, para seus clientes (usualmente com cotas baseadas no histórico de compra). Desta forma, a melhor alternativa na atual situação seria minimizar o uso de ACN, encontrar outro solvente para substituí-lo (exemplo: metanol), ou mudar para outra técnica cromatográfica como o cromatografia com fluido supercrítico (SFC).

O objetivo deste trabalho é examinar as várias possibilidades de convivemos com o fato de que a diminuição e incerteza na oferta, assim como o aumento de custo do ACN, requerem urgentemente uma mudança de atitude da maior parte dos usuários de cromatografia líquida, assegurando a continuidade de seus trabalhos.

2. Diminuição no diâmetro interno da coluna (di)

Esta é a forma mais visível através da qual se pode economizar mais de 90% de acetonitrila sem modificar o cromatograma obtido, e sem grandes modificações no método de análise. A Figura 3 ilustra, em escala, a diminuição do diâmetro interno das colunas em LC, enquanto que a Tabela 1 apresenta o consumo típico de uma coluna em função do diâmetro interno.

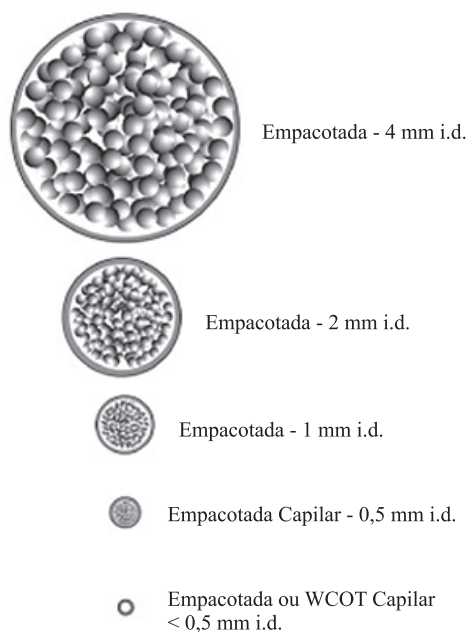


Figura 3. Comparação entre o diâmetro interno de colunas de HPLC, em escala.

Tabela 1. Consumo de solvente em função do volume de uma coluna de HPLC ($k=6$)

Dimensões da coluna	Volume da coluna	Consumo de solvente
9,0 x 250 mm	10,0 mL	80,0 mL
4,6 x 250 mm	2,5 mL	19,0 mL
4,6 x 150 mm	1,5 mL	12,0 mL
4,0 x 80 mm	0,5 mL	4,5 mL
2,1 x 150 mm	0,3 mL	2,5 mL

Observa-se que o volume de solvente para eluir um pico da coluna, com o mesmo valor de k , depende muito das dimensões da mesma. Isso ocorre porque a mudança no diâmetro interno da coluna faz com que a velocidade linear média

ótima (μ ótimo) e, portanto, o fluxo ou vazão da fase móvel, varie com as dimensões da coluna (Tabela 2).

Tabela 2. Fluxos típicos empregados nas colunas de LC (Fc) em função do diâmetro interno (d.i.)

Denominação da Coluna	Dimensões(d.i.)	Fluxo (Fc) típico
Tubulares abertas	< 25 μ m	< 25 nL/min
Nanobore	25 μ m a 100 μ m	25 - 4.000 nL/min
Capilar	100 μ m a 1 mm	0,5 - 200 μ L/min
Microbore	1 mm a 2,0 mm	50 - 1.000 μ L/min
Narrowbore	2,0 mm a 4,0 mm	0,2 - 2,0 mL/min
Padrão	4,0 mm a 4,6 mm	1,0 - 5,0 mL/min
Semi-preparativas	4,6 mm a 10 mm	5,0 - 40 mL/min
Preparativas	> 10 mm	> 20 mL/min

Este efeito é ainda mais pronunciado quando se utilizam colunas capilares ou com dimensões nano, para as quais fluxos (vazões) da ordem de 0,1 a 10 microlitros/minuto são ideais. Assim, em uma análise típica empregando-se uma coluna “padrão” de HPLC ($L=15$ cm; $d_i=4$ mm; $d_p=5$ microns) a um fluxo(vazão) de 1 mL/min, ao longo de 8 horas (480 minutos) de trabalho o consumo de solvente será de cerca de meio litro de solvente. Assumindo-se 20 dias de trabalho/mês neste ritmo, o consumo deste cromatógrafo será de 10 litros de solvente./mês (ou mais de 100 litros/ano). A mesma separação poderá ser obtida empregando-se uma coluna de micro-LC($L=15$ cm; $d_i=0,2$ mm; $d_p=5$ microns) operando a um fluxo de 1 μ L/min. Isso daria um consumo de 60 microlitros/h; ou 500 microlitros (0,5mL)/dia; ou 10 mL/mês; ou 100 mL/ano. Assim, esta última coluna operaria ao longo de um ano empregando apenas 0,1 Litro de solvente, mil vezes menos do que a anterior, sem modificar o solvente. Em empresas farmacêuticas, as quais empregam vários cromatógrafos líquidos para controle de qualidade, P&D, estudos de bioequivalência e equivalência farmacêutica, dentre outros, a economia de solvente pode ser significativa, sem alteração nos cromatogramas obtidos. Regra geral, a redução do diâmetro interno da coluna permite uma redução no uso de solvente e amostra a qual é proporcional ao quadrado do

inverso do d.i.(Tabela 3). Por exemplo, comparando-se uma coluna com d.i. 4,6 mm com outra coluna de d.i. 2,1 mm de mesmo comprimento, a economia em solvente e amostra será de aproximadamente 5 vezes, ou seja:

$$(4,6 / 2,1)^2 = 4,8.$$

Mantendo-se a mesma velocidade linear média para as duas colunas, o tempo de retenção dos compostos não será afetado.

Tabela 3. Efeito do diâmetro interno da coluna (di) no consumo de fase móvel

D.I.	Fluxo Típico	Fluxo empregado	Consumo Relativo de Fase Móvel
4,6 mm	1 - 2 mL/min	1,0 mL/min	1,0
3,0 mm	0,3 - 1 mL/min	0,4 mL/min	0,4
2,1 mm	0,2 - 0,4 mL/min	0,2 mL/min	0,2
1,0 mm	50 - 200 µL/min	0,05 mL/min	0,05
0,5 mm	10 - 30 µL/min	0,01 mL/min	0,01
0,32 mm	5 - 10 µL/min	0,005 mL/min	0,005
0,20 mm	1 - 5 µL/min	0,001 mL/min	0,001
50 µm	0,1 - 0,2 µL/min	0,0001 mL/min	0,0001

Apesar de conceitualmente muito simples, a mudança de HPLC para micro-LC pode dar inicialmente um certo trabalho pelo fato de a miniaturização da coluna exigir maiores atenções com o equipamento. Uma vez que a maior parte dos equipamentos em operação nos laboratórios foi projetada para trabalhar com HPLC (alguns “adaptados” na própria fábrica para aceitar colunas micro), os volumes do sistema de injeção, cela de detecção, e das tubulações empregadas para conectar as partes, especialmente entre o injetor e a coluna, e entre esta e o detector, são muito superiores aos adequados para o sistema micro-LC. Assim, uma redução drástica no diâmetro interno e comprimento dos tubos empregados em conexões, no volume interno da cela de detecção (no caso de detectores espectrofotométricos o projeto da cela é igualmente importante) e no sistema de introdução da amostra é mandatório para se obterem picos com a qualidade esperada. Equipamentos não apropriados para micro-LC tendem a apresentar picos largos, falta de reprodutibilidade no tempo de retenção devido a

flutuações no fluxo (vazão) da bomba ou mudanças de pressão no caso de bombas do tipo seringa, além de outros problemas que deterioram a forma dos picos. Portanto, as reais vantagens das colunas de micro-LC somente podem ser obtidas empregando-se equipamento apropriado para as mesmas.

3. Diminuição no comprimento do tubo (L)

Uma vez que o tempo de retenção de um composto depende do tempo em que ele passa na coluna, quanto menor o comprimento da coluna (menor L) menor será também o tempo de retenção. Assim, empregando-se colunas mais curtas, obtém-se análise mais rápidas com menor consumo de solvente. Entretanto, quanto menor o comprimento da coluna, mantidas as outras dimensões (di e dp) menor será a eficiência da mesma (N). A maneira de obter-se uma boa eficiência, análise rápida, e pouco consumo de solvente, consiste em diminuir-se o tamanho das partículas da fase estacionária.

4. Diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária (df)

A variação do tempo de retenção de um analito em função do tamanho das partículas da fase estacionária, mantendo-se os demais parâmetros fixos, é dada por:

$$t_R = \frac{(1+k)Nh}{D_m \cdot \mu} dp^2$$

onde t_R é o tempo de retenção; k = fator de retenção; N = número de pratos da coluna; h = altura de um prato; D_m = difusão do analito na fase móvel; μ = velocidade linear da fase móvel. Observa-se que o t_R e, portanto o tempo de análise, diminuirá com o quadrado do tamanho das partículas.

Em cromatografia líquida “clássica” (antecedeu o desenvolvimento da HPLC) o tamanho das partículas era tipicamente entre 60 e 200 microns. Desde os princípios do desenvolvimento da HPLC, era conhecido o fato de que uma diminuição no tamanho das

partículas ocasionaria uma dramática mudança no tempo de retenção e, como consequência, no tempo de análise e volume de solvente empregado. Entretanto, era já também conhecido que a diminuição no diâmetro das partículas acarretava um aumento na pressão do sistema, de acordo com:

$$\Delta P = \frac{\phi L \eta}{100 dp^2}$$

onde ΔP é a variação da pressão na coluna (entrada e saída), também conhecida como queda da pressão na coluna.

A maneira ideal encontrada para balancear todos estes parâmetros foi diminuir-se o tamanho das partículas (dp) e do comprimento da coluna (L), mantendo-se as pressões dentro de valores razoáveis e obtendo-se análises mais rápidas e com menor consumo de solventes. A Tabela 4 ilustra uma relação entre estes vários parâmetros para colunas de HPLC. Torna-se evidente que a melhor alternativa para economia de tempo e solvente é diminuir-se L e dp . Até o início do século XXI, o padrão de dimensão das colunas para HPLC era $L = 25$ cm; $di = 4,6$ mm; $dp = 5$ microns. Um grande esforço foi feito no final do século passado e primeira década deste, para adequar estes valores ao discutido anteriormente.

Tabela 4. Relação entre o tamanho de partículas (dp), variação de pressão na coluna (ΔP), comprimento da coluna (L) e o tempo de retenção (t_R).

Tamanho de partículas (dp , μm)	Queda de pressão (ΔP , psi)	Comprimento (L , cm)	Tempo de retenção (t_R , min)
10	1.000	25	10
5	2.000	12.5	5
2	5.000	5	2

Com base na teoria já conhecida, e o desenvolvimento de instrumentos mais apropriados para trabalhar com partículas menores, desenvolveu-se uma forma mais inteligente de aproveitar-se o potencial da HPLC. Partículas com $dp = 3$ microns e, posteriormente, $dp \cong 1,5$ microns, passaram a ser comercializadas em tubos mais curtos ($L = 3-10$ cm), gerando colunas tão eficientes quanto as anteriores porém com análises muito mais

rápidas e com menor consumo de solvente. No momento, este enfoque tem sido o preferido, principalmente pelas indústrias farmacêuticas. Observando este rápido desenvolvimento das partículas de dp menores, a indústria de equipamentos e colunas rapidamente adaptou-se á novidade e praticamente todos os grandes nomes da área oferecem esta solução, com diferentes fabricantes. Deve-se ter em mente que assim como a diminuição no diâmetro interno da coluna requer mudanças na instrumentação, conforme discutido no item 1, a diminuição do dp também requer um aperfeiçoamento dos equipamentos convencionais de forma a se aproveitar ao máximo as vantagens destas colunas.

5. Eliminando a ACN como eluente

Em muitas situações práticas, a acetonitrila pode ser totalmente substituída por outro solvente como metanol, etanol ou THF, ajustando-se a composição da nova fase estacionária. Geralmente utiliza-se para tal a série eluotrópica e valores do índice de polaridade (P') dos solventes². A relação entre P' e k é dada por:

$$\frac{k_2'}{k_1'} = 10^{(P_2 - P_1)/2}$$

onde k_1 e k_2 representam os fatores de retenção do analito nas duas fases móveis. O índice de polaridade de uma fase móvel pode ser determinado pelo conhecimento do índice de polaridade de cada solvente e a composição da fase móvel através de:

$$P = X_1 P_1 + X_2 P_2 + \dots$$

A título de exemplo, deseja-se avaliar a possibilidade de substituir uma fase móvel constituída por acetonitrila: água (50:50), por outra contendo metanol: água. Qual será a composição da nova fase para ser “equivalente”? Os valores dos índices de polaridade são $P'_{ACN} = 5,8$; $P'_{MeOH} = 5,1$. Substituindo-se os valores na equação acima, encontraremos que a composição da nova fase deverá ser 56% MeOH

e 44% H₂O para ter a força de eluição equivalente à da mistura 50% ACN:50% H₂O. Com frequência, a adição de um terceiro solvente (exemplo THF) pode ser necessária para obter-se a separação desejada². A porcentagem necessária dos principais solventes usados em HPLC para obter-se fases móveis similares àsquelas empregando ACN é mostrada na Figura 4. Deve-se observar que as diferentes viscosidades dos solventes ocasionam fases móveis que provocam diferentes quedas de pressão na coluna. Assim, os valores da Figura 4, assim como os obtidos pelas equações anteriores, devem ser vistos como um guia e não como um resultado final para a substituição das fases.

Considerando a atual escassez de ACN no mercado internacional, essa substituição pode ser uma boa opção econômica.

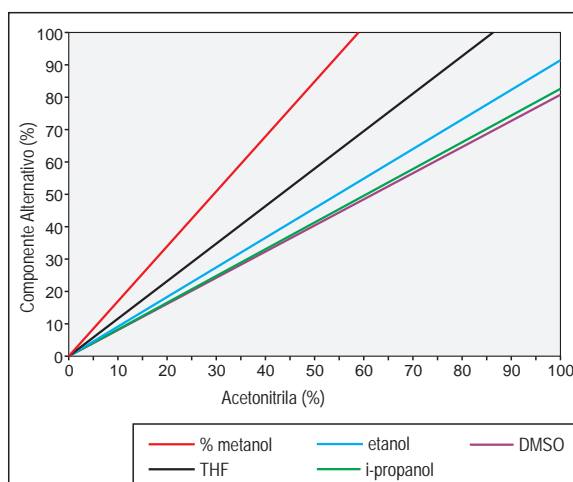


Figura 4. Porcentagem necessária de um solvente (MeOH, THF, EtOH, i-Prop, DMSO) necessária para obter-se uma fase móvel com força de eluição similar.

6. Mudando os hábitos: a “Green Chemistry”

Várias tentativas (inclusive quando o preço internacional da ACN ainda era “razoável”) foram efetuadas nos últimos 20 anos para substituir-se os solventes orgânicos empregados em HPLC por outros ambientalmente (e toxicologicamente) corretos. Dentre eles, o de maior sucesso (ainda que modesto até o presente) tem sido o uso de fluidos no estado supercrítico, notadamente o dióxido de carbono como fase móvel. Apesar de

que nessa técnica se empregam praticamente os mesmos instrumentos e colunas da HPLC, desde seu surgimento tem sido tratada como uma técnica separada, denominada Cromatografia com Fluido Supercrítico (SFC). Um fluido supercrítico é qualquer composto cuja temperatura e pressão encontram-se, ambos, acima da pressão crítica e da temperatura crítica³. Apresenta propriedades intermediárias entre os gases e os líquidos, e uma seletividade diferente de ambos. Muitos dos métodos que empregam solventes orgânicos em HPLC têm sido transformados para SFC, com vantagens. Uma das principais aplicações desta técnica, no presente, é na área farmacêutica, principalmente na separação de isômeros ópticos em que a seletividade e tempo de análise são bastante mais satisfatórios que a HPLC. Uma vez que o solvente “universal” da técnica é o CO₂, além de ambiental e toxicologicamente correto, esta técnica não requer o uso de ACN. Algumas variações desse método têm sido o uso de água no estado subcrítico⁴ e o uso de CO₂ misturado com solventes orgânicos, na técnica denominada Cromatografia Líquida com Fluidez Aumentada, EFLC⁵.

O impacto crescente dos compostos orgânicos no meio ambiente (pesticidas, compostos fluorados, descarga de medicamentos, e muitos outros) tem desenvolvido, ainda que de modo devagar, uma nova consciência a respeito da preservação do meio ambiente. É a denominada “Química Verde” (“Green Chemistry”), a qual poderá ter um papel preponderante nos próximos anos. Seguindo esta vertente, a SFC e métodos relacionados significam um grande avanço da química verde nos métodos de separação.

7. Reciclando o solvente

Desde o início da HPLC existe uma preocupação de efetuar o reciclo (reuso) do solvente, especialmente em operações nas quais o solvente não muda de composição durante a análise, ou seja, em uma situação isocrática. Nos primórdios da técnica, o efluente saindo da coluna ia para o detector e, ao sair deste, era simplesmente redirecionado para o frasco de eluente, e utilizado como tal. Uma vez que a

quantidade de analito que saía do detector era muito pequena, comparada com a quantidade de solvente, os contaminantes estariam na fase móvel em concentrações da ordem de ppb, o que não era determinado pelos detectores então empregados em HPLC. O desenvolvimento dos detectores mais sensíveis, e o acoplamento com espectrometria de massas (LC/MS), juntamente com a exigência de menores limites de quantificação (LOQ), fizeram com que a contaminação se tornasse indesejável, motivando o desenvolvimento de sistemas de reciclo da fase móvel. Os primeiros sistemas eram baseados no tempo de retenção dos analitos presentes na amostra. À medida que a corrida se aproximava do tempo de retenção de um analito, a fase móvel que saía da coluna era direcionada para o lixo; passado o tempo de retenção do analito, ela era direcionada para o frasco da fase móvel. Apesar de executados de forma automática, estes sistemas, os quais aparecerem no início da década de 1970, apresentavam como maior problema o fato de o tempo de retenção poder mudar durante uma análise devido a vários motivos, incluindo mudanças na temperatura da coluna, falta de reprodutibilidade da bomba; entupimento da coluna e muitos outros. A alternativa existente era estabelecer uma janela de segurança na coleta do solvente ao sair do detector, geralmente ao redor de 10 a 15 %, o que acarretava uma diminuição considerável na economia de fase móvel. A geração seguinte de sistemas de reciclo era baseada em um limite estabelecido para a altura do pico (“*threshold*”): se o pico do analito saindo do detector fosse superior ao limite estabelecido, o solvente era descartado, e se fosse inferior (portanto a contaminação seria pequena), retornaria ao frasco da fase móvel. A atual geração de sistemas de reciclo baseia-se em algoritmos desenvolvidos inicialmente para os integradores eletrônicos, posteriormente utilizados nos atuais sistemas de detecção e quantificação de picos existentes nos atuais softwares de aquisição e tratamento de dados. O sistema é capaz de reconhecer em tempo real que um pico cromatográfico está atingindo o detector e de automaticamente atuar uma válvula para desviar o efluente da coluna para o descarte. Tão

logo a inclinação do pico chegue a um valor pré-determinado pelo software, indicando que a eluição do componente está concluindo, a válvula de reciclo é novamente acionada e o solvente – isento do analito – é enviado para o frasco da fase móvel. Neste caso, se o cromatograma apresenta muitos picos, a economia de solvente é bastante menor, uma vez que parte considerável do solvente será enviada para descarte juntamente com os analitos separados. O reciclo de solventes também não é recomendável para técnicas como exclusão por tamanho e troca iônica, assim como para micro-LC, a qual já significa *per se* uma economia substancial de fase móvel, não justificando a compra do sistema de reciclo para tal.

8. Aumentando a temperatura em LC

O efeito da programação da temperatura é muito conhecido em cromatografia gasosa, sendo hoje parte essencial de maioria dos métodos empregados em HRGC (cromatografia gasosa de alta resolução). Em cromatografia líquida, entretanto, este efeito é ainda muito pouco utilizado pelo fato de a otimização das separações ser geralmente efetuada com programação da fase móvel (ou gradiente da fase móvel). No início da HPLC observou-se a importância do controle da temperatura da coluna, de forma a manter o tempo de retenção reprodutível. Isso era particularmente importante empregando-se cromatografia líquida em fase reversa, cujo mecanismo de separação é baseado em processos de partição, os quais por dependerem da solubilidade relativa do analito entre as fases estacionárias e móvel requerem um controle da temperatura. Posteriormente foi observado que um aumento na temperatura da coluna usualmente facilita a solubilização do analito na fase móvel, encurtando o tempo de retenção e, como consequência, a economia de fase móvel. Como regra geral, um aumento de 10°C na temperatura de uma coluna operando em fase reversa diminui o tempo de retenção para a metade do valor inicial. Lembrar que o aumento da temperatura provoca uma diminuição da

constante dielétrica (“polaridade”) da água como fase móvel, o que permite seletividades únicas em temperaturas elevadas. Alguns métodos utilizam água pura como eluente, em temperaturas elevadas, com sucesso. O uso de temperaturas superiores a 80°C deve ser feito com cautela, pois dependendo da qualidade da fase suas propriedades poderão mudar (consulte seu fornecedor de colunas).

9. Programando a temperatura em Cromatografia Líquida

As primeiras tentativas de efetuar-se programação de temperatura em cromatografia líquida, na década 1970, falharam porque a espessura do tubo de metal utilizado para preparar as colunas era muito grande e a distribuição do calor não era uniforme, com temperaturas distintas na parede externa da coluna (aplicada), na parede interna do tubo de aço e no meio da fase estacionária. No início da década de 1980, empregando-se colunas de diâmetro interno 1 mm, denominadas microbore na época, foi possível ilustrar-se as primeiras aplicações da programação de temperatura em LC. Atualmente, com o desenvolvimento das colunas capilares de sílica fundida, de diâmetro muito menor e feitas de material que conduz bem o calor, a programação de temperatura pode ser realizada com maior simplicidade e vantagens. A Figura 5 mostra um exemplo do efeito da programação de temperatura em cromatografia líquida capilar, e o resultado na diminuição no tempo de retenção do analito (e, como

consequência, economia de solvente). Estudos recentes empregando colunas convencionais de HPLC (di= 2 a 4,6 mm) sugerem que a programação de temperatura pode também ser empregada com sucesso para essas colunas⁶. A economia de solvente será ainda mais crítica neste caso.

10. Mudando características da fase estacionária

Outra maneira de economizar fase móvel é otimizar-se a escolha da fase estacionária de maneira a minimizar o tempo de retenção dos analitos, mantendo a separação desejada, o que pode ser obtido de diferentes formas.

Diminuindo o comprimento da cadeia alquílica ancorada na sílica em cromatografia em fase reversa, ou seja, utilizando uma fase menos hidrofóbica, diminuirá o tempo de retenção dos analitos e, como consequência, o consumo de fase móvel. De forma análoga, o tempo de retenção pode ser mantido o mesmo, diminuindo-se a força de eluição da fase móvel, o que pode ser feito diminuindo-se a quantidade do solvente orgânico na mesma (e, novamente, economizando solvente). Assim, por exemplo, se em uma separação a coluna contém octadecilsilano (ODS, C-18 ou RP-18), como fase estacionária, mudando-se para octilsilano (C-8 ou RP-8) o tempo de retenção dos analitos deverá diminuir. Alternativamente, fases com cadeias ainda mais curtas como C-4, C-3 e mesmo C-1 são disponíveis comercialmente (lembrar que, diminuindo o tamanho da cadeia

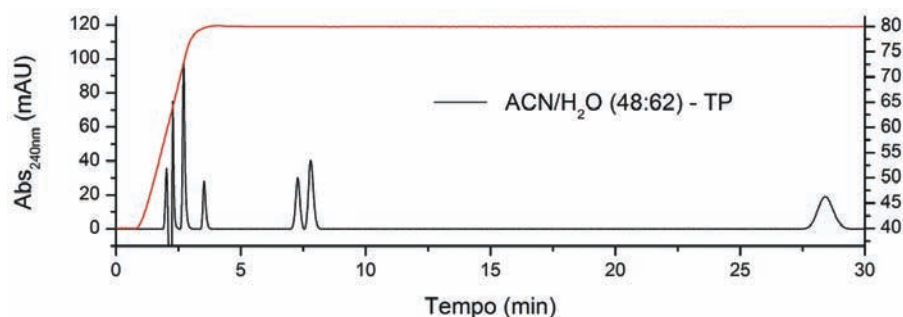


Figura 5. Separação de estatinas por Cromatografia Líquida Capilar com programação de temperatura. Composição da fase móvel 48% ACN e 52% água acidificada com 0,5% de ácido acético. Programação de temperatura: 1 minuto em 40°C e então 20°C/min até 80°C permanecendo nesta temperatura até o final da análise. Fluxo da fase móvel: 3 µL/min.⁷

lateral, a superfície da sílica fica mais exposta e interações como por exemplo com grupos silanóis fica mais fácil, o que pode mudar a seletividade da fase).

Diminuindo a área superficial da fase estacionária (em HPLC esse valor varia geralmente entre 90 e 300 m²/g) também é uma forma de diminuir o tempo de retenção e aumentar a economia de fase móvel. A retenção de um analito em cromatografia é proporcional à quantidade de fase estacionária disponível para interação com o mesmo. Diminuindo a área superficial diminui-se também a quantidade de fase estacionária disponível para o analito na mesma coluna. Na prática, a maneira mais comum de diminuir a área superficial é utilizar partículas com poros maiores (300 Å ao invés de 100 Å, por exemplo).

11. Dicas adicionais

Uma forma de diminuir o tempo de retenção (e economizar fase móvel) é alterar o pH da fase móvel, especialmente se os compostos de interesse tiverem caráter ácido ou básico e fase reversa estiver sendo utilizada (neste modo os compostos de caráter neutro não são afetados por mudanças no pH da fase móvel). Caso a idéia seja manter o tempo de retenção com a mudança de pH, um ajuste, diminuindo a quantidade do solvente orgânico da fase móvel, deve ser executado. É necessária cautela quando da alteração do pH para valores muito ácidos ou muito básicos, pois certas fases estacionárias não suportam grandes variações de pH e se deterioram irreversivelmente. Verifique a documentação fornecida com a coluna, ou consulte o fabricante da mesma antes de mudar drasticamente o pH da fase móvel.

Muitas vezes o tempo de análise e quantidade de fase móvel usadas podem ser bastante reduzidos, trocando-se o modo cromatográfico. Por exemplo, muitas separações difíceis de serem realizadas por troca iônica podem ser obtidas com sucesso, empregando-se cromatografia em fase reversa com emparelhamento de íons. Muitos fármacos são melhor separados por cromatografia em fase

normal do que em fase reversa, apesar de que esta última opção continua sendo a mais empregada e muitos analistas sequer tentam o uso de fase normal – a qual evita por completo o uso de acetonitrila.

12. Conclusões

Acetonitrila é o solvente orgânico mais empregado em cromatografia líquida atualmente. A grande maioria dos métodos que operam com fase reversa foram desenvolvidos, e validados, empregando acetonitrila como parte da fase móvel. Fatores contextuais internacionais recentemente elevaram o preço da ACN no mercado internacional a valores muito elevados, juntamente com a imposição de racionamento da compra do mesmo. Portanto, urgem novas medidas para enfrentar a nova situação (no site de uma grande empresa americana de peptídeos, eles anunciam que uma grande equipe está realizando um combate contra a escassez de acetonitrila). Neste artigo são sugeridas dez alternativas para conseguir-se diminuir ou mesmo eliminar o uso de ACN, através de diferentes enfoques. Um dos mais populares no momento está sendo um novo salto, similar ao que ocorreu no desenvolvimento da HPLC, o qual recomenda uma miniaturização da coluna cromatográfica: diminuição no diâmetro interno da coluna (micro-LC ou nano-LC) com imensa economia de solvente, ou no comprimento do tubo (fast-LC, UHPLC, UPLC, e outros nomes) com consequente diminuição no diâmetro médio das partículas para valores entre 1,5 e 1,8 microns. Esta última opção permite uma economia menor de fase móvel quando comparada com a micro-LC, porém permite economia de tempo de análise maior. Essas opções implicam mudanças no equipamento e aquisição de novas colunas. Outra alternativa apresentada é a substituição da ACN por outros eluentes; um grande esforço tem sido feito para uso de metanol na substituição. Essa alternativa não exige mudanças no instrumento, nem de coluna. Aumento na temperatura de eluição e mudanças no pH da fase móvel são também alternativas interessantes, porém o usuário deve

consultar antes a documentação de sua coluna, pois a maioria das colunas de HPLC foram projetadas para operar em temperaturas baixas e dentro de uma faixa estreita de valores de pH.

Independentemente da alternativa, o usuário de ACN como fase móvel para HPLC deve estar atento para o fato de que o custo do solvente aumentou muito, inclusive no Brasil, sua disponibilidade diminuiu bastante, e a projeção de melhora dessa situação a curto e médio prazo parece fora de cogitação. É o momento de os cromatografistas aprenderem a utilizar as ferramentas disponíveis, e entenderem que a acetonitrila não é a única fase móvel para cromatografia líquida. Mãos à obra, faça sua escolha, e sucesso.

Referências Bibliográficas

1. Sigma-Aldrich. *Availability of acetonitrile*. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/acetonitrile_shortage.Par.0001.File.tmp/acetonitrile_shortage.pdf>.
2. Lanças, F.M. *Cromatografia Líquida Moderna*, Editora Átomo, Campinas (SP), 2009.
3. Lanças, F.M., *Supercritical Fluids*; Dekker Encyclopedia of Chromatography, J. Cazes (Ed.), Marcel Dekker, USA (2001).
4. Lanças, F.M., J.S. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 2006, v. 17, n. 1, pp. 85-89.
5. Olesik, S.V. *J. Chromatogr. A*, 1037, 405-410 (2004).
6. Vanhoenacker, G, Pat Sandra, J. *Sep. Sci.*, 1822 – 1835 (2006).
7. Monteiro, A.M., Coutinho, L., Santos Neto, A.J., Lanças, F.M., resultados não publicados, 2008.