

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

Dissertação de Mestrado

Título: Separação de uma mistura de compostos digitálicos em escala semi-preparativa através de cromatografia líquida por deslocamento.

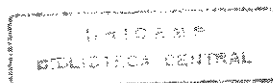
Candidata: Regina Clélia da Costa Mesquita 3680

orientador
Orientador : Carol H. Collins - Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da tese, defendida por Regina C. C. Mesquita, e aprovada pela comissão julgadora

Carol H. Collins
26.08.94

**Campinas - SP
1994**



Aos meus pais, Regina e Mesquita, e esposo Antonio que sempre me incentivaram e que com seu apoio, muitas vezes, transformaram meus grandes problemas em experiência de vida.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Steven M. Cramer pela boa vontade com que me recebeu em seu laboratório e dedicação com que me orientou.
- À Profa. Dra. Carol H. Collins por sua orientação, paciência, disponibilidade de auxílio e confiança de que um dia este trabalho ficaria pronto.
- Aos meus irmãos Rosângela e Rubens e ao meus avós Benedita e Domingos por seu apoio e carinho.
- À Maria Regina V. Vaz pela sua confiança e estímulo.
- À Joe Gerstner, Michael Phillips e Kim Young pela colaboração, coleguismo e discussões esclarecedoras.
- À Giuseppina e ao Giovanni Micaroni que, muitas vezes, acreditaram mais em mim do que eu mesma.
- À Sharon e à Raquel por sua amizade e incentivo.
- À Profa. Dra. Isabel Cristina e ao Prof. Dr. Kenneth Collins pelas discussões e sugestões de grande valia.
- À CODETEC e ao RHAE que pelo apoio tornaram possível a realização deste trabalho.
- À Hoechst do Brasil pelo apoio na elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Resumo	x
Abstract	xi
PARTE I: Apresentação	
I.1 Introdução	1
I.2 Objetivos	2
I.3 Apresentação do Trabalho	2
	3
PARTE II: Revisão Bibliográfica	
II.1 Considerações Gerais sobre Cromatografia	4
II.1.1 Princípios Básicos e Definições	5
II.1.2 Considerações sobre Cromatografia Preparativa	5
II.2 Características e Aplicações da Cromatografia Líquida por deslocamento	9
II.2.1 Histórico	11
II.2.2 Princípios Básicos	11
II.2.3 Tipos de Fases e Deslocador	12
II.2.4 Efeitos da Variação de Parâmetros	17
II.2.5 Equipamentos	19
II.2.6 Vantagens e Desvantagens	23
II.2.7 Exemplos de Aplicações	25
II.2.8 Perspectivas	27
II.3 Métodos de Medição de Isotermas aplicadas à Cromatografia por Deslocamento	31
II.3.1 Introdução	32
II.3.2 Modelo de Langmuir	32
II.3.3 Métodos de Medição de Isotermas Individuais	33
II.3.4 Métodos de Medição de Isotermas Competitivas	35
II.4 Considerações sobre os Compostos Digitálicos	41
II.4.1 Características Gerais	44
II.4.2 Sistemas Cromatográficos Empregados para Separação dos Compostos Digitálicos em Escala Analítica	44
II.4.3 Sistemas utilizados para a Separação de Compostos Digitálicos em Escala Preparativa	47
	54

PARTE III: Parte Experimental	57
III.1 Materiais	58
III.1.1 Reagentes	58
III.1.2 Colunas	58
III.2 Equipamentos	58
III.2.1 Cromatografia por Eluição	58
III.2.2 Cromatografia por Deslocamento	59
III.2.3 Medição de Isotermas	60
III.3 Procedimentos	61
III.3.1 Testes de Limite de Solubilidade	61
III.3.2 Testes de Eluição	61
III.3.3 Medição de Isotermas	61
III.3.4 Curvas de Calibração	63
III.3.5 Cromatografia por Deslocamento	64
III.3.6 Análises das Frações	64
III.3.7 Regeneração da Coluna	64
III.3.8 Avaliação da Eficiência da Coluna	64
PARTE IV: Resultados e Discussões	66
IV.1 Seleção do Sistema Cromatográfico	67
IV.1.1 Testes de Limite de Solubilidade.	67
IV.1.2 Testes de Eluição	68
IV.1.3 Curvas de Calibração	73
IV.2 Medição de Isotermas	75
IV.2.1 Medição de Isotermas Individuais pelo Método de Tempo de Retenção	76
IV.2.2 Medição de Isotermas Individuais pelo Método de Análise Frontal	78
IV.3 Cromatografia por Deslocamento	82
IV.3.1 Regeneração e Avaliação da Eficiência da Coluna	82
IV.3.2 Ensaios de Cromatografia por Deslocamento	83
PARTE V: Conclusão	98
PARTE VI: Bibliografia	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

PARTE II: Revisão Bibliográfica

Figura

II.1	Classificação de cromatografia pelas formas físicas	5
II.2	Métodos de desenvolvimento em cromatografia	6
II.3	Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos	7
II.4	Estágios de operação em cromatografia por deslocamento	13
II.5	Representação gráfica das isotermas dos componentes da amostra e da linha operacional, assim como da correspondente série de deslocamento completamente desenvolvida	15
II.6	Limites inferior e superior de concentração do deslocador	21
II.7	Esquema de um sistema conjugado: fracionador e analisador em linha utilizado em cromatografia por deslocamento	24
II.8	Separação de uma mistura de ácidos hidroxifenilacético por deslocamento	27
II.9	Separação de uma mistura de antibióticos polimixínicos por deslocamento	28
II.10	Separação de uma mistura de corticoesteróides por cromatografia por deslocamento	28
II.11	Fórmula estrutural dos corticoesteróides cuja separação por deslocamento encontra-se representada na figura II.10	29
II.12	Separação de uma mistura de nucleotídeos por cromatografia por deslocamento	29
II.13	Separação de uma mistura de proteínas por cromatografia por deslocamento	30
II.14	Purificação de fragmentos da interleucina β humana por cromatografia por deslocamento	31
II.15	Curva obtida com a elevação da concentração do soluto de C_a para C_b	35
II.16	Curva obtida com a diminuição da concentração do soluto de C_b para C_a	36
II.17	Gráfico adimensional do tempo de retenção reduzido do máximo da banda versus o fator de carregamento para colunas com diferentes eficiências	40
II.18	Representação esquemática de um experimento de análise frontal	42

II.19	Isotermas competitivas e individuais de p-cresol e fenol	44
II.20	Fórmula estrutural do lanatosídeo C, da digoxina e da digitoxina	46
II.21	Hidrólise do lanatosídeo C à digoxina	46
II.22	Separação de glicosídeos secundários	51
II.23	Separação de digoxina, digitoxina e seus metabolitos, por eluição em gradiente	51
II.24	Separação de três derivados 4-nitrobenzóicos de cada uma das séries A, B, C, D, e E de glicosídeos digitálicos	52
II.25	Separação de glicosídeos secundários de <i>Digitalis lanata</i>	53
II.26	Separação de digoxina, digitoxina e seus metabolitos	53
PARTE III: Parte Experimental		
III.1	Esquema da aparelhagem utilizada nos testes de cromatografia por eluição	59
III.2	Esquema da aparelhagem utilizada nos testes de cromatografia por deslocamento	60
PARTE IV: Resultados e Discussões		
IV.1	Cromatograma do teste de eluição com a fase móvel metanol/água (80:20 v/v)	71
IV.2	Cromatograma do teste de eluição com a fase móvel metanol/água (65:35 v/v)	72
IV.3	Curva de calibração dos compostos digitálicos utilizando-se octadecilsilano e metanol/água (80:20 v/v)	74
IV.4	Curva de calibração do octanol	74
IV.5	Curva de calibração do hexanol	75
IV.6	Isotermas de adsorção medidas pelo método do tempo de retenção a 25°C	77
IV.7	Isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal, a 25°C, empregando-se metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel	79
IV.8	Extrapolação das isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal, a 25°C empregando-se metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel	79
IV.9	Isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal, a 25°C, utilizando-se metanol/água (65:35 v/v) como fase móvel	80
IV.10	Extrapolação das isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal, a 25°C empregando-se metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel	81
IV.11	Separação da mistura digoxina/digitoxina por eluição em coluna Zorbax ODS	84

IV.12	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, usando octanol como deslocador	85
IV.13	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, usando octanol como deslocador	85
IV.14	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 40°C, usando octanol como deslocador	86
IV.15	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina por eluição a 45°C, usando duas colunas ligadas em série	87
IV.16	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se octanol como deslocador	88
IV.17	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se octanol como deslocador	88
IV.18	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 45°C, empregando-se octanol como deslocador	89
IV.19	Separação da mistura digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se octanol como deslocador	90
IV.20	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se hexanol como deslocador	91
IV.21	Eluição sobrecarregada de solução de digoxina e lanatosídeo C na fase móvel	92
IV.22	Separação mistura lanatosídeo C/digoxina por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se hexanol como deslocador	93
IV.23	Separação mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina em metanol/água (65:35 v/v) por eluição com metanol/água (80:20 v/v)	
IV.24	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina em metanol/água (65:35 v/v) por eluição com metanol/água (65:35 v/v e 80:20 v/v)	95
IV.25	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina em metanol/água (65:35 v/v) por cromatografia por deslocamento empregando-se uma mistura metanol/água (65:35 v/v) por 54 min, seguida por octanol 24,6 mg/ml em metanol/água (80:20 v/v) a 0,2 ml/min	96
IV.26	Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina em metanol/água (65:35 v/v) por cromatografia por deslocamento, empregando-se metanol/água (65:35 v/v) por 54 minutos, seguido de octanol 23,0 mg/ml em metanol/água (80:20 v/v) como deslocador	97

ÍNDICE DE TABELAS

	<i>Página</i>
PARTE II: Revisão Bibliográfica	
<i>Tabela</i>	
II.1 Sistemas cromatográficos para a separação analítica de compostos digitálicos	49
PARTE III: Parte Experimental	
III.1 Concentrações utilizadas para a medição de isothermas pelo método de tempo de retenção	62
III.2 Concentrações utilizadas para a medição de isothermas pelo método de análise frontal	62
PARTE IV: Resultados e Discussões	
IV.1 Limite de solubilidade	67
IV.2 Testes de eluição	68
IV.3 Testes de seleção do deslocador	73
IV.4 Parâmetros <i>a</i> e <i>b</i> da isoterma de Langmuir obtidos pelo método do tempo de retenção	76
IV.5 Medida da isoterma de adsorção do octanol no sistema Zorbax ODS/metanol:água (80:20 v/v) pelo método de análise frontal	78
IV.6 Eficiência da coluna cromatográfica usada em ensaios de desloca- mento	83

Título: Separação de uma mistura de compostos digitálicos em escala semi-preparativa através de cromatografia líquida por deslocamento.

Candidata: Regina Clélia da Costa Mesquita

Orientadora: Carol H. Collins - UNICAMP

RESUMO

Um estudo da aplicação da técnica de cromatografia por deslocamento na separação semi-preparativa de uma mistura dos compostos digitálicos cardiotônicos: lanatosídeo C, digoxina e digitoxina foi conduzida. Após a realização dos testes de solubilidade e eluição em escala analítica, selecionou-se um sistema cromatográfico que empregava octadecilsilano (Zorbax ODS) como fase estacionária e uma mistura metanol/água 80:20 ou 65:35 como fase móvel. Selecionou-se octanol e hexanol como deslocadores, os quais foram empregados em concentrações de 13,6 a 74,4 mg/ml na fase móvel. Fez-se as medidas das isotermas destes deslocadores, assim como a dos componentes da mistura. Nos ensaios de deslocamento fez-se o estudo da variação de diversos parâmetros, a saber: comprimento da coluna, concentração do deslocador, temperatura e volume de amostra. Os resultados de deslocamento foram comparados com o da eluição sobrecarregada, nas mesmas condições, e elucidam as diferenças entre as duas técnicas, mostrando a grande potencialidade de aplicação da técnica de deslocamento na separação preparativa de compostos de interesse farmacológico em equipamentos utilizados para análise.

ABSTRACT

The technique of high performance displacement chromatography was applied to the semi-preparative separation of a mixture of three digitalic glycosides: lanatoside C, digoxin and digitoxin, which are active as cardiotonics. The mobile and stationary phases selected, based on the criteria of high solubility and good separation were: methanol/water 80:20 and 65:35 (v/v) and octadecylsilane (Zorbax ODS 5 μm). Octanol and hexanol were used as displacers in concentrations ranging from 13,6 to 74,4 mg/m in the mobile phase. The isotherms of the compounds and displacers were measured. The effects of variation of temperature, displacer concentration, sample volume and column length on the displacement were also studied. This work illustrates the differences between the preparative separations of overloaded elution and displacement chromatography, showing the high potencial of the latter when applied to separation of mixtures in equipment used for analytical scale analyses.

PARTE I: APRESENTAÇÃO

1.1 Introdução

A cromatografia líquida por eluição à baixa e médias pressões é uma técnica de separação bastante empregada na purificação de produtos naturais e biológicos em escala preparativa. Porém, nos últimos anos, vêm aumentando o interesse numa outra técnica cromatográfica, a cromatografia por deslocamento, a qual, apesar de ter sido observada por Tswett em 1906, caiu em desuso após o advento da cromatografia por partição iniciada por James e Martin em 1952.⁽¹⁾ A técnica de deslocamento vem sendo aplicada com sucesso na separação de peptídeos e proteínas^(2,3,4), apresentando significativa vantagem sobre a cromatografia líquida por eluição quando se necessita fazer o aumento de escala do processo.

As vantagens da utilização da técnica de deslocamento em escala preparativa, aliada ao fato desta ter sido muito pouco empregada na separação de produtos naturais^(5,6), nos motivou para o desenvolvimento do presente trabalho.

A seleção dos compostos a serem utilizados foi feita baseada nos seguintes critérios: grande interesse farmacológico, indisponibilidade ou grande complexidade da rota sintética e necessidade de purificação por cromatografia. Desta forma, optou-se pelo uso de uma mistura de compostos digitálicos obtidos a partir da *Digitalis lanata* através de extração etanólica seguida de purificação cromatográfica^(7,8,9). Estes compostos possuem amplo emprego em farmacologia devido às suas propriedades cardioativas e são de difícil separação, uma vez que possuem grande similaridade estrutural.

1.2 Objetivo

Considerando o exposto, este trabalho tem por objetivo investigar a possibilidade dos compostos digoxina, digitoxina e lanatosídeo C, obtidos por extração da *Digitalis lanata*, virem a ser purificados cromatograficamente usando o desenvolvimento por deslocamento.

1.3 Apresentação do Trabalho

Este trabalho encontra-se dividido em cinco partes: apresentação, revisão bibliográfica, parte experimental, apresentação e discussão dos resultados e conclusão.

A revisão bibliográfica possui uma subdivisão em quatro itens que apresentam considerações gerais sobre cromatografia, características e aplicações da cromatografia líquida por deslocamento, medição de isothermas e considerações gerais sobre os compostos digitálicos. Os conceitos apresentados nesta revisão são suficientes para a compreensão e contextualização do trabalho.

Na parte experimental encontram-se descritos os materiais, a instrumentação, os testes para a seleção do sistema cromatográfico, os testes de cromatografia por deslocamento e a medição das isothermas de adsorção.

A apresentação e discussão dos resultados possui uma subdivisão em três itens: seleção do sistema cromatográfico, medição de isothermas e cromatografia por deslocamento.

A conclusão com as considerações finais complementa este trabalho.

PARTE II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Considerações Gerais sobre Cromatografia

II.1.1 Princípios Básicos e Definições

Entre os métodos modernos de análise e purificação, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas de análise.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

Existem diversos critérios empregados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação e aos diferentes tipos de fase utilizados. A figura II.1 mostra as classificações da cromatografia, segundo as formas físicas mais encontradas.

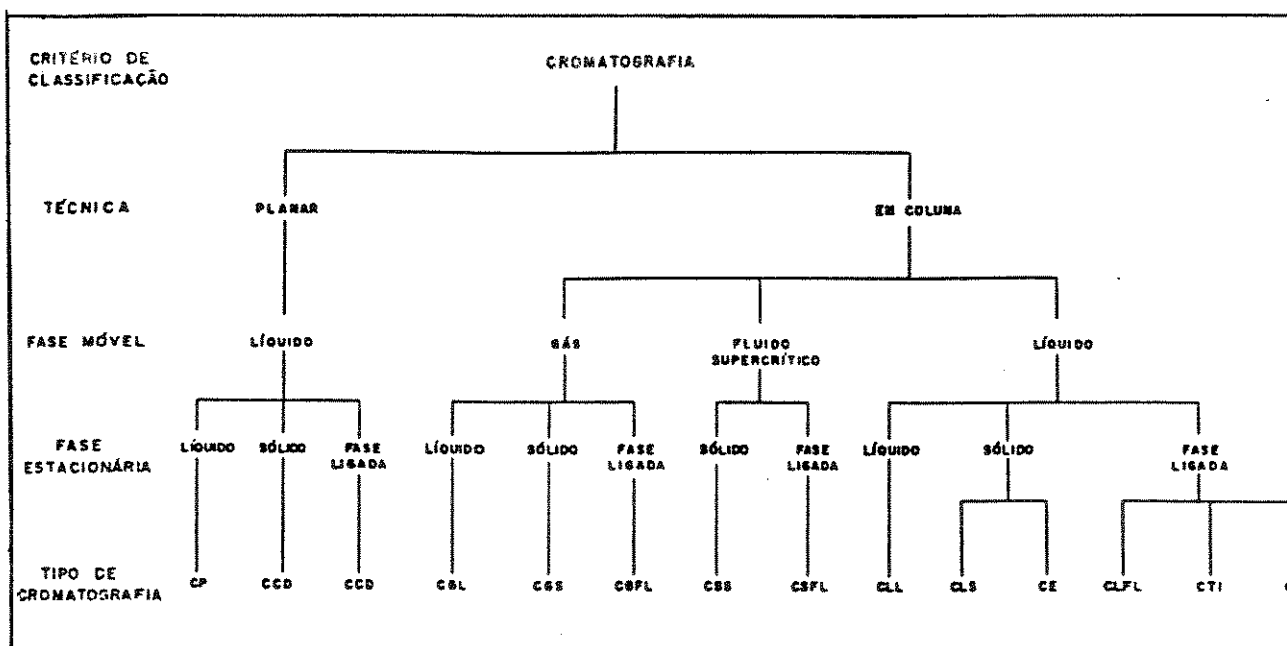


Figura II.1: Classificação de cromatografia pelas formas físicas.⁽¹⁰⁾

No entanto, o método de introdução da amostra e seu subsequente desenvolvimento constitui um outro critério de classificação. A introdução da amostra em uma única aplicação e seu desenvolvimento com uma fase móvel pura, que arrasta a amostra ao

longo da coluna, contendo a fase estacionária, é o método da eluição, mais comumente encontrado em cromatografia analítica. Na cromatografia preparativa, especialmente em nível industrial, freqüentemente usa-se o desenvolvimento por deslocamento, onde os componentes da amostra, uma vez aplicados à coluna, são arrastados ao longo da mesma usando, como fase móvel, um deslocador que é mais atraído pela fase estacionária que qualquer um dos componentes. Também se encontra em uso industrial a análise frontal, onde a amostra é continuamente aplicada à coluna, sendo o componente menos retido o único que sai na forma pura (Figura II.2).⁽¹⁰⁾

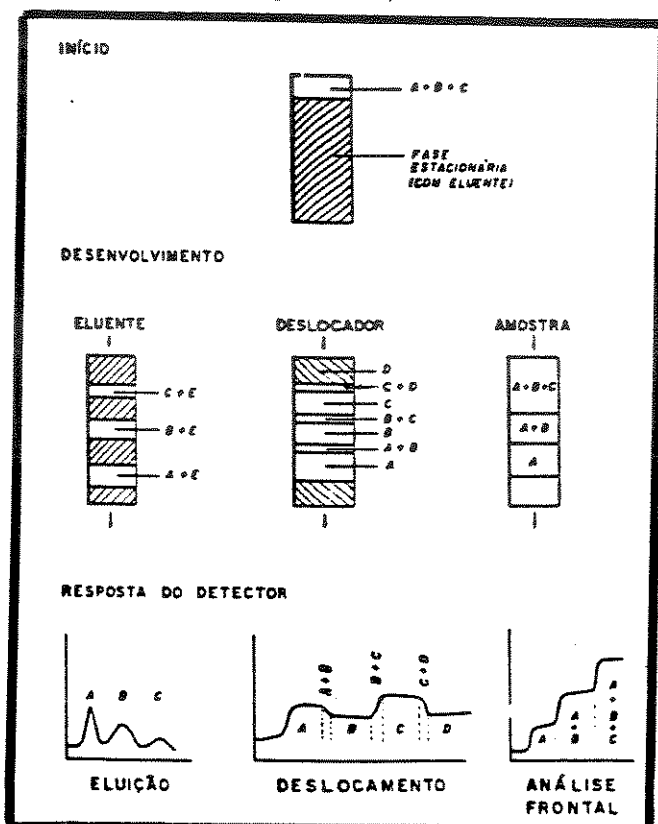


Figura II.2: Métodos de desenvolvimento em cromatografia.⁽¹⁰⁾

De acordo com a aplicação da cromatografia, a forma de coleta dos produtos separados pode variar. Desta forma, nas aplicações analíticas, normalmente, tem-se um fluxo contínuo de fase móvel até que todos os componentes tenham saído da coluna e as suas presenças sejam detectadas e indicadas graficamente. No entanto, quando objetiva-se a separação em escala preparativa, o eluato é coletado em frações de volumes idênticos, cujas concentrações são medidas, podendo-se obter um cromatograma através da construção de um gráfico contendo a concentração em função do volume total eluído.

Independentemente da modalidade e da aplicação, a cromatografia possui alguns parâmetros que auxiliam na análise dos resultados fornecidos por uma dada técnica de separação cromatográfica. Tais parâmetros fazem uso de medidas feitas nos cromatogramas obtidos (Figura II.3).

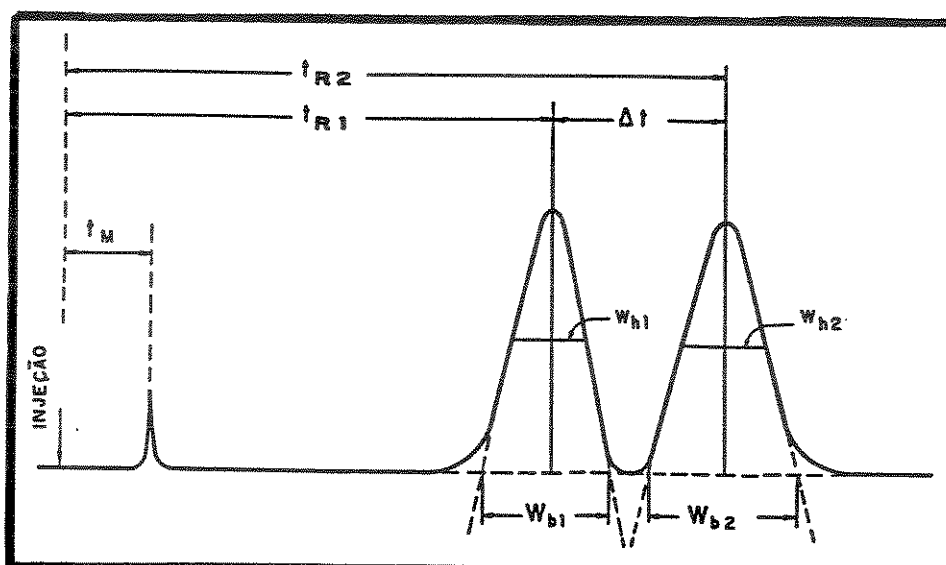


Figura II.3: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.⁽¹¹⁾

O tempo de retenção do soluto (t_R) é um termo bastante utilizado nas aplicações analíticas, enquanto que, em escala preparativa, costuma-se empregar o volume de retenção do soluto (V_R). Estes termos são relacionados através da vazão da fase móvel (F), de acordo com a expressão:

$$V_R = t_R F \quad (\text{II.1})$$

Um outro parâmetro que também está relacionado à retenção de soluto na coluna é a razão de distribuição das massas (D_m). Este termo é obtido através da razão entre os tempos que o soluto fica na fase estacionária e fica percorrendo a coluna na fase móvel, conforme pode ser observado na expressão:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{II.2})$$

onde t_M = tempo de retenção de um soluto não retido

t'_R = tempo de retenção ajustado

Idealmente, D_m deve estar na faixa de 2 a 6, pois valores inferiores a 2 são indicativos de pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial em aplicações analíticas, enquanto valores superiores a 6 indicam grande retenção, implicando em longo tempo de análise.

As razões de distribuição das massas (D_m) ou os tempos de retenção ajustados (t'_R) são utilizados para calcular o fator de seletividade (α), de acordo com a expressão:

$$\alpha = \frac{D_{M_2}}{D_{M_1}} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} \quad (\text{II.3})$$

O fator de seletividade (α) é um parâmetro indicativo da separação de dois picos adjacentes e seu valor numérico deve ser superior a 1,2 para que os picos apresentem uma boa separação.

A resolução (R_s) é um outro termo utilizado para a determinação da separação entre dois picos consecutivos. Este parâmetro pode ser obtido com base nos tempos de retenção (t_R) e nas larguras de base (w_b) ou nas larguras dos picos à meia altura (w_h)

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (\text{II.4})$$

$$R_s = 1,177 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (\text{II.5})$$

A expressão II.5, ou seja, a largura do pico à meia altura, é normalmente empregada quando se analisa picos assimétricos ou cromatogramas apresentando inclinação na linha de base.

Para uma separação ideal o valor da resolução (R_s) deve ser superior a 1,5. Porém, em aplicações qualitativas, um valor de cerca de 0,8 é aceitável.

A eficiência de uma coluna cromatográfica é normalmente avaliada utilizando-se o número de pratos teóricos (n). Um prato teórico equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre as fases móvel e estacionária. Portanto, quanto maior o número de pratos teóricos de uma coluna, melhor a sua eficiência na separação de compostos.

$$n = 16 \left[\frac{t_R}{w_b} \right]^2 = 5,545 \left[\frac{t_R}{w_h} \right]^2 \quad (\text{II.6})$$

onde a largura do pico à meia altura (w_h) também pode ser obtida a partir da medida da área do pico (A) e de sua altura (h) de acordo com a expressão:

$$w_h = 0,9394 (A/h) \quad (\text{II.7})$$

Existem diversos fatores que podem alterar o valor do número de pratos teóricos obtidos para uma dada coluna, a saber: condições de análise, quantidade e tipo de soluto e, principalmente o comprimento da coluna. Desta maneira, a avaliação comparativa entre duas colunas é, geralmente, feita através do uso da altura equivalente a um prato

teórico (h), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos teóricos (n), conforme pode ser observado na expressão:

$$h = \frac{L}{n} \quad (\text{II.8})$$

II.1.2 Considerações sobre Cromatografia Preparativa

A cromatografia é, basicamente, uma técnica de separação. Quando aplicada à coleta de material puro, ela é denominada cromatografia preparativa. O seu objetivo é a extração da máxima quantidade de material na forma mais pura possível.

Para este propósito, dois tipos de variantes são usadas:

- a) cromatografia líquida convencional ou por batelada;
- b) cromatografia líquida contínua.

Na cromatografia por batelada, uma fase sofre movimentação (a fase móvel) e a outra permanece estacionária. Na cromatografia contínua, a fase estacionária move-se contra-corrente à fase móvel. Ajustando-se o fluxo das fases, pode-se enriquecer e separar um componente ou mesmo um grupo de compostos em uma ou outra direção.^(12,13)

A cromatografia líquida em escala preparativa tornou-se rapidamente um método de escolha para separação, isolamento e purificação de substâncias químicas, especialmente no caso de produtos com aplicação biológica e medicinal. A tecnologia de preparação de colunas com alta eficiência e seletividade, inicialmente aplicada exclusivamente à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica, pode agora ser aplicada no isolamento de grandes quantidades de material puro a partir de misturas complexas. A maior contribuição para o desenvolvimento da cromatografia preparativa foi dada pela necessidade de purificação de produtos de engenharia genética, como por exemplo: a purificação de produtos de fermentação, onde as restrições severas quanto aos níveis de impurezas permitidos requeriam grau de seletividade só atingidos por métodos cromatográficos.⁽¹⁴⁾

Existe uma diferença fundamental entre cromatografia analítica e preparativa e, devido a isso, a estratégia de otimização utilizada para um problema de separação e para a escolha de um determinado tipo de instrumentação também difere. Em química analítica, o produto de uma separação é a informação, enquanto que, em métodos preparativos, o objetivo é o isolamento e preparação de substâncias puras.^(12,14)

Enquanto em aplicações analíticas de cromatografia enfatizam-se a resolução e o tempo de análise, em escala preparativa a quantidade de material isolada por unidade de tempo e o grau de pureza são parâmetros críticos. Além disso, no caso da cromatografia preparativa, o custo do processo de purificação é de extrema importância, pois estes gastos representam de 40 a 80% do custo envolvido na preparação de certos produtos.

Por exemplo, no caso de produtos de fermentação de DNA recombinante, a purificação representa 80 a 90% do custo do processo.^(14,15)

Deve-se mencionar, no entanto, que a purificação de biomateriais geralmente envolve uma série de operações básicas, algumas das quais são repetidas várias vezes. Tipicamente, as operações de separações básicas envolvem precipitação, cristalização, extração e adsorção.⁽¹⁵⁾

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica é utilizada para a separação de compostos na faixa de miligramas a picogramas. Ao mesmo tempo em que estudam-se inovações para a otimização da separação analítica, não há barreiras intrínsecas que impeçam o aumento de escala da CLAE para aplicações em processos. A tecnologia de separação por cromatografia líquida de alta eficiência já vem sendo utilizada há algum tempo para o isolamento de alguns miligramas de compostos em alto grau de pureza. No entanto, sistemas de CLAE em escala de processo só começaram a ser utilizados nos últimos dez ou quinze anos. Estes sistemas podem processar quilogramas de material bruto em escala de tempo de minutos.⁽¹⁵⁾

O desenvolvimento de um processo de separação envolve, usualmente, colunas de CLAE convencional nos estágios iniciais. Geralmente, tenta-se eluir o composto de interesse em 3 a 8 volumes de coluna. As fases estacionária e móvel são selecionadas de forma a permitir a máxima resolução prática. Isto irá permitir a pureza adequada das frações quando a coluna for carregada com as elevadas concentrações utilizadas em processos de separação. Através do desenvolvimento de separações analíticas, pode-se otimizar rapidamente as condições de processo, minimizando o tempo e material envolvidos.⁽¹⁵⁾

Atualmente, muitos trabalhos^(16 a 22) vêm sendo publicados onde a partir de um tratamento teórico e das condições otimizadas de uma separação analítica em CLAE, pode-se otimizar as condições do processo de separação em escala preparativa.

No desenvolvimento do processo de separação, a otimização em escala analítica é tipicamente seguida do aumento de carga muito além da faixa analítica, da coleta de frações e da definição da faixa de concentração (miligramas de produto bruto/gramas de fase estacionária) que permite a coleta de frações com a pureza desejada.

O custo de um processo de separação por CLAE normalmente situa-se na faixa de US\$ 30/kg a US\$ 200/kg, sendo o consumo de fase móvel o maior responsável por estes custos.⁽¹⁵⁾

Com relação ao tipo de fase estacionária empregada em CLAE preparativa, tanto fases orgânicas como inorgânicas têm sido utilizadas. Porém, a mais usada é a sílica gel, devido ao maior conhecimento em relação à esta, seu baixo custo e ao fato de poder-se realizar ensaios iniciais por cromatografia em camada delgada. No entanto, algumas características negativas da sílica gel, tais como adsorção irreversível e reatividade em

relação a alguns compostos, fazem crer que no futuro o uso de sílica gel derivatizada venha a ganhar maior importância em processos preparativos.⁽²³⁾

II.2 Características e Aplicações da Cromatografia Líquida por Deslocamento

II.2.1 Histórico

Nos últimos trinta anos, a cromatografia gasosa, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência por eluição tornaram-se as técnicas mais utilizadas para a análise de misturas complexas. Desta forma, a maioria dos textos cromatográficos publicados neste período não citava a cromatografia por deslocamento, a qual também pode ser aplicada na separação de misturas através de cromatografia líquida, gasosa e em camada delgada.

Em 1906, Tswett já havia observado que, em colunas sobrecarregadas com a amostra, o deslocamento de um componente por outro poderia ocorrer mesmo durante a cromatografia por eluição. No entanto, foi somente em 1943 que Tiselius classificou, pela primeira vez, a cromatografia segundo o método de introdução da amostra e seu subsequente desenvolvimento. Desta forma, caracterizou-se a cromatografia por eluição, por deslocamento e a análise frontal.⁽¹⁾

A cromatografia gasosa por deslocamento foi utilizada pela primeira vez por Claesson⁽²⁴⁾ e Phillips⁽²⁵⁾, antes da introdução da cromatografia gás-líquido por James e Martin em 1952. A partir desta época, a cromatografia gasosa passou a ser utilizada quase que exclusivamente por eluição e este é, provavelmente, um dos motivos pelos quais a cromatografia por deslocamento só veio a se desenvolver mais recentemente.

A cromatografia líquida por deslocamento foi utilizada por Spedding e colaboradores⁽²⁶⁾ para a separação de complexos de terras-raras em coluna de troca iônica. Este processo foi utilizado para a preparação destes compostos puros durante os anos cinquenta e sessenta, sendo que o efeito de alguns parâmetros operacionais na separação foram estudados com grande detalhamento.

Ainda nesta época, a separação de proteínas^(27,28) e de hidrolizados de proteínas^(27 a 34) através de cromatografia por deslocamento foi extensivamente analisada. Porém, a eficiência relativamente baixa das colunas empregadas neste período não permitiu que a cromatografia por deslocamento se tornasse o processo de escolha.

Atentando-se para a história da cromatografia por deslocamento pode-se concluir que, após o sucesso inicial da técnica, devido principalmente a Tiselius e seus colaboradores, esta não pode se desenvolver a um processo de separação e competir com a cromatografia por eluição que havia tornado-se predominante após a introdução da

cromatografia de partição por Martin e Synge.⁽¹⁾ O maior obstáculo a seu desenvolvimento foi a inadequação das propriedades dos adsorventes, da eficiência da coluna e dos equipamentos para obter-se uma boa demarcação das bandas adjacentes. Além disso, a rápida emergência da teoria da cromatografia por eluição linear forneceu a base necessária para lidar-se com os aspectos cinéticos e termodinâmicos desta modalidade de cromatografia, enquanto que a complexidade teórica da cromatografia não linear dificultou ainda mais a aplicação da cromatografia por deslocamento.

Toda esta situação se reverteu quando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se a técnica de separação mais amplamente utilizada no final dos anos setenta. A disponibilidade de novas fases estacionárias com micropartículas que favorecem as propriedades termodinâmicas e resultam em alta eficiência da coluna e a alta sofisticação atingida pela instrumentação utilizada em CLAE, possibilitaram a elucidação do fenômeno físico-químico associado com a retenção. Por outro lado, a teoria da cromatografia não linear do deslocamento teve um grande impulso decorrente principalmente dos trabalhos de Helfferich.^(35,36,37) Consequentemente, os principais obstáculos foram removidos e o potencial da cromatografia líquida de alta eficiência por deslocamento pôde começar a ser melhor explorado na década de oitenta. Hórvath^(1,5,38 a 41) foi o pioneiro neste renascimento da cromatografia líquida por deslocamento, realizando bio-separações em escala preparativa utilizando-se de equipamentos e colunas normalmente empregados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica.

II.2.2 Princípios Básicos^(1,38)

A separação de compostos a partir de misturas complexas, como as obtidas em processos extrativos ou fermentativos, é um dos maiores problemas enfrentados pela indústria farmacêutica na atualidade. Além disso, a necessidade crescente de produtos de alta pureza fez com que a importância dos processos cromatográficos em escala preparativa fosse substancialmente aumentada.⁽¹²⁾

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se a técnica analítica mais utilizada para biomoléculas devido ao desenvolvimento de fases estacionárias altamente seletivas e eficientes, além da sofisticada instrumentação. Desta forma, as vantagens da CLAE em escala analítica começaram a ser mais exploradas em processos preparativos, visando atender a essa necessidade de produtos de grande pureza.

No atual contexto, a cromatografia por deslocamento está emergindo rapidamente como uma potente técnica preparativa devido à alta pureza dos compostos separados e à grande recuperação ("rendimento") associados ao processo e também às vantagens que a mesma apresenta quando comparada aos processos preparativos convencionais por eluição, a saber: uso de amostras concentradas, possibilidade de concentração do produto separado durante o processo, menor consumo de fase móvel e estacionária e possibilidade de utilização de fase estacionária microparticulada.

Na cromatografia por deslocamento, a coluna recheada com a fase estacionária é primeiramente equilibrada com uma fase móvel, a qual possui baixa afinidade pela fase estacionária. Seqüencialmente, a solução da amostra contendo a mistura dissolvida na fase móvel é introduzida de forma que seus componentes são adsorvidos no topo da coluna. Subseqüentemente, a solução do deslocador, o qual possui maior afinidade pela fase estacionária que qualquer um dos componentes da amostra, é bombeada para a coluna. Uma vez que a coluna seja suficientemente longa, os componentes da amostra distribuem-se sob a influência da frente do deslocador que percorre a coluna, dando origem a uma série de zonas de deslocamento que são pulsos de concentração de substância pura (na forma de ondas quadradas consecutivas), todos movendo-se com a mesma velocidade. Um diagrama contendo os estágios de operações na cromatografia por deslocamento é mostrado na figura II.4. Conforme será demonstrado posteriormente, as concentrações do soluto nas zonas são maiores do que as obtidas na eluição linear em condições similares.

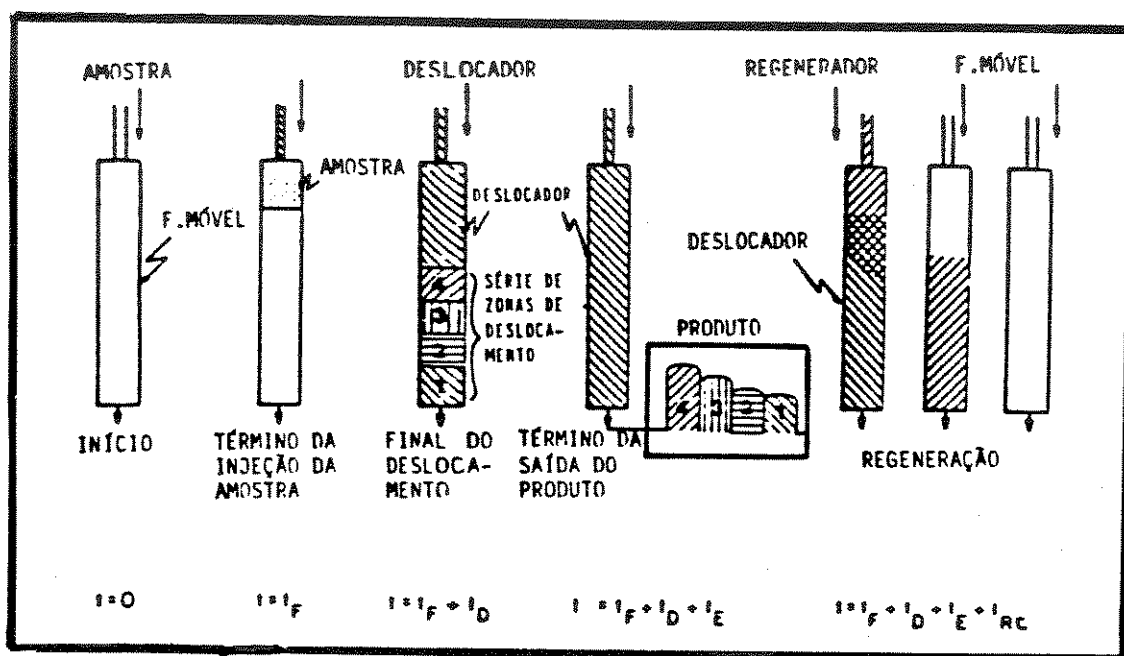


Figura II.4: Estágios de operação na cromatografia por deslocamento. Os tempos envolvidos em cada uma das etapas são: t_F = tempo de injeção da amostra; t_D = tempo de desenvolvimento das zonas de deslocamento; t_E = tempo de saída dos produtos; t_{RC} = tempo de regeneração da coluna.⁽³⁸⁾

O processo de cromatografia por deslocamento visa a obtenção de uma série de zonas de deslocamento completamente desenvolvida, de maneira que todos os componentes da amostra sejam separados e emirjam no efluente da coluna, onde podem ser coletados como frações individuais, em concentrações relativamente altas. A separação deve ser acompanhada pelo uso de uma técnica de análise adequada dos efluentes da coluna.

Durante a introdução da amostra no topo da coluna, os componentes saturam a fase estacionária e há a ocorrência de análise frontal. O deslocador deve possuir maior afinidade pela fase estacionária que qualquer um dos componentes da amostra e a concentração de sua solução é crítica na determinação do comprimento de coluna necessário para o desenvolvimento completo da série de deslocamento. A velocidade da frente do deslocador movendo-se ao longo da coluna depende da adsorvidade e concentração do deslocador e determina velocidade da série de deslocamento. A sequência de saída dos componentes individuais em relação à frente do deslocador corresponde à afinidade crescente da espécie pela fase estacionária. Portanto, na figura II.4, os componentes 1 e 4 são os mais fracamente e o mais fortemente adsorvidos, respectivamente.

Após a saída do último componente da amostra da coluna, o deslocador deve ser removido e a coluna reequilibrada com a fase móvel. A necessidade de regeneração da coluna, uma etapa operacional que não contribui diretamente para a separação, é uma característica indesejável deste técnica.

Num desenvolvimento total da série de deslocamento a separação é completa e, portanto, um maior tempo de residência na coluna não resultará em melhor separação. As propriedades de uma série de deslocamento completamente desenvolvida possuem uma relação simples com as isotermas dos componentes da amostra e do deslocador, assim como com a concentração deste último. Fixada a concentração do deslocador, pode-se traçar uma reta que une a origem à isoterma do deslocador na concentração selecionada, esta reta é denominada linha operacional. A linha operacional, juntamente com as isotermas, determina se os componentes da amostra sofrerão ou não deslocamento e em que concentração serão coletados.

Utilizando-se uma coluna suficientemente longa, o deslocamento sucessivo dos componentes de uma amostra pelo deslocador e pelos demais componentes à medida que estes fluem na coluna, resulta em uma série de deslocamento completamente desenvolvida. Esta série é constituída por pulsos de concentração, na forma de ondas quadradas adjacentes, dos componentes individuais da amostra em sequência crescente de afinidade pela fase estacionária.

A figura II.5 mostra a separação de quatro componentes, sendo o primeiro (pico 1) separado por eluição, observa-se que a sua isoterma não cruza a linha operacional (figura II.5A). Os demais componentes (2-4) sofrem deslocamento, na ordem prevista pelas suas isotermas. De modo contrário à cromatografia por eluição, na qual os picos caminham com diferentes velocidades, no estágio final do desenvolvimento por deslocamento, todos os componentes movimentam-se com a mesma velocidade determinada pela isoterma de adsorção e concentração do deslocador. Esta condição é denominada "isostática". A separação é baseada na competição dos componentes pelos sítios ativos da fase estacionária, sendo, portanto, um processo não linear.

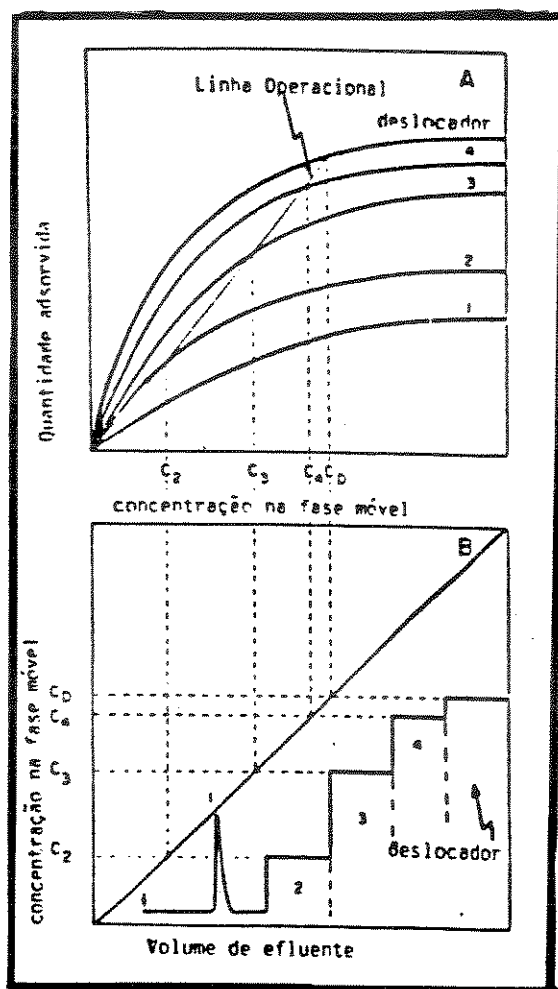


Figura II.5: Representação gráfica das isothermas dos componentes da amostra e da linha operacional (A), assim como da correspondente série de deslocamento completamente desenvolvida (B). As concentrações de cada zona, determinadas pela interseção da linha operacional e da isoterma de adsorção dos componentes, são projetadas de A e B através do uso de uma reta com ângulo de 45 com a abcissa.⁽³⁸⁾

A velocidade de uma etapa de concentração, u_i , da espécie i da concentração da fase móvel para C_i , numa coluna cromatográfica é dada pela seguinte equação:

$$u_i = \frac{u_0}{1 + (\phi q_i / C_i)} \quad (\text{II.9})$$

onde u é a velocidade móvel, ϕ é a razão de fase na coluna e q_i é a quantidade de soluto i adsorvida por unidade de volume da fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel, tendo uma concentração de soluto C_i . Conforme pode ser observado na figura II.5, q_i/C_i é o coeficiente angular da reta que se liga à isoterma na concentração C_i e determina a velocidade das espécies de acordo com a equação II.9. Portanto, a igualdade das velocidades das zonas numa série completamente desenvolvida implica que os coeficientes angulares das retas que se ligam às isothermas do deslocador e dos componentes presentes na série de deslocamento possuem o mesmo valor, formando uma só reta denominada linha operacional. Isto é mostrado na figura II.5 e pode ser expresso pelas seguintes equações:

$$u_D = u_1 = u_2 = \dots = u_i = \dots = u_n \quad (\text{II.10})$$

$$\frac{q_D}{C_D} = \frac{q_1}{C_1} = \frac{q_2}{C_2} = \dots = \frac{q_i}{C_i} = \dots = \frac{q_n}{C_n} \quad (\text{II.11})$$

onde D refere-se ao deslocador. Da figura II.5 e da equação II.11 segue que as concentrações dos componentes nas zonas completamente desenvolvidas são determinadas pela interseção das isothermas de adsorção individuais com a linha operacional. Conseqüentemente, a concentração do soluto em cada uma das zonas de uma série de deslocamento completamente desenvolvida é determinada pela linha operacional e pela isoterma e, portanto, a altura da zona é característica para um dado soluto. No entanto, o princípio de conservação de massa requer que a largura de cada zona seja proporcional à quantidade de soluto, que deve ser constante na zona, com a exceção das fronteiras. Estas características da cromatografia por deslocamento são consideradas bastante atrativas para separações analíticas, uma vez que a medição da altura e largura das zonas oferece um meio simples de identificação e determinação quantitativa dos componentes individuais. A figura II.5 mostra também que a altura da zona deve aumentar com a retenção como conseqüência da interseção da linha operacional com a isoterma em concentrações mais elevadas. Como resultado, quando a concentração de um componente da amostra é menor que sua concentração característica, este torna-se mais concentrado no curso da cromatografia por deslocamento.

Na figura II.5 encontra-se representada uma série de deslocamento completamente desenvolvida em condições ideais, ou seja, na ausência de dispersão axial e equilíbrios químicos secundários entre os componentes. Para condições cromatográficas ideais e utilizando-se as isothermas competitivas apropriadas, pode-se aplicar uma série de equações algébricas, conhecidas como "transformação H", que permitem uma completa descrição do processo com o cálculo das concentrações dos componentes no efluente para um dado comprimento de coluna.⁽¹⁾

A comparação de valores calculados através da "transformação H" com os cromatogramas obtidos experimentalmente em estágios intermediários de desenvolvimento por deslocamento mostraram boa concordância, apesar de terem sido utilizadas as isothermas de adsorção dos componentes individuais ao invés de isothermas competitivas. Apesar da teoria negligenciar o efeito da transferência de massa relativamente lenta e da cinética do deslocamento, ela desenvolveu-se de tal modo a permitir que simples cálculos computacionais sejam suficientes para prever o comprimento de coluna necessário para uma série de deslocamento de mistura multicomponente completamente desenvolvida ou para o estágio de deslocamento que resulta em separação satisfatória para uma dada situação prática.⁽¹⁾

Alguns outros modelos matemáticos^(42 a 45) foram desenvolvidos para a simulação de cromatografia por deslocamento não ideal. Estes modelos normalmente incorporam o efeito da lenta transferência de massa e da dispersão axial, facilitando a otimização e o aumento de escala de separações por deslocamento. No entanto, a aplicabilidade destes

tratamentos teóricos depende da disponibilidade de dados das isotermas dos compostos no sistema considerado.

II.2.3 Tipos de Fase Móvel, Fase Estacionária e Deslocador: Princípios para Seleção

A fase móvel utilizada em cromatografia por deslocamento pode ser um solvente puro, uma mistura de solventes ou uma solução como, por exemplo, um tampão.⁽³⁹⁾

Como nos demais tipos de cromatografia preparativa, a solubilidade é um parâmetro chave para a seleção da fase móvel. Este é um fator ainda mais importante em cromatografia por deslocamento, a qual é mais eficiente quando efetuada a altas concentrações, requerendo maior solubilidade dos compostos a serem separados.⁽¹⁾

Uma vez que uma das características da cromatografia por deslocamento é a concentração dos componentes durante a separação, pode vir a ocorrer a precipitação na coluna se a fase móvel ficar saturada com algum dos componentes da mistura, o que resultará em entupimento da mesma. Para evitar este tipo de situação, pode-se utilizar temperaturas mais elevadas para aumentar a solubilidade.⁽¹⁾

Outros requisitos para a fase móvel incluem inércia química, baixa viscosidade e toxicidade, assim como compatibilidade com a fase estacionária e o equipamento. A fase móvel também deve ser facilmente removível do produto, sem deixar resíduos para facilitar a recuperação do mesmo.⁽¹⁾

Testes de eluição em CLAE ou cromatografia em camada delgada podem ser convenientemente utilizados na seleção de uma fase móvel apropriada para a fase estacionária escolhida para a separação por cromatografia por deslocamento. É desejável que os componentes possuam alta retenção no sistema selecionado.⁽³⁹⁾

As fases estacionárias utilizadas em CLAE por eluição também podem ser empregadas em CLAE por deslocamento. Estas devem permitir forte retenção dos componentes da amostra a ser separada, possuir alta capacidade e possibilitar rápida cinética de deslocamento sem adsorção irreversível ou efeitos catalíticos. As isotermas de adsorção dos componentes na fase estacionária devem ser côncavas para preencherem os requerimentos para sistemas de deslocamento bem comportados. A alta eficiência das colunas é essencial para minimizar a superposição de bandas que pode ser extremamente nociva para eficiência de separação em cromatografia por deslocamento. Outros requisitos são a rápida regenerabilidade e o longo tempo de vida nas condições operacionais.⁽¹⁾

As colunas de sílica quimicamente ligadas a grupamentos alquila, normalmente empregadas em cromatografia em fase reversa, são frequentemente utilizadas em cromatografia por deslocamento com fases móveis aquosas. As isotermas de diversos

compostos analisados neste tipo de fase estacionária mostraram comportamento próximo ao descrito no Modelo de Langmuir. Colunas de micropartículas de sílica gel oferecem uma outra alternativa, sendo a escolha feita com base na solubilidade dos componentes da amostra nos solventes escolhidos como fase móvel, assim como na seletividade da coluna.⁽¹⁾

Fases estacionárias trocadoras de íons, apesar de suas baixas capacidades, são utilizadas algumas vezes, especialmente quando os componentes da amostra são retidos muito fracamente ou muito fortemente às fases ligadas não polares.⁽³⁸⁾

A escolha do deslocador é o aspecto mais crítico na obtenção da máxima eficiência de separação em processos por deslocamento.⁽⁴⁰⁾

O primeiro requisito básico para um deslocador é a maior retenção no sistema do que qualquer outro componente da amostra, ou melhor, sua isoterma de adsorção deve ficar acima da de todos os outros componentes a serem deslocados. O deslocador também não deve reagir com nenhum dos componentes da amostra e deve possuir alta solubilidade na fase móvel selecionada. Além disso, o deslocador deve ser facilmente removível dos componentes da amostra separada que sofram uma possível contaminação com este. Ele deve ter baixa toxicidade, ser barato e resultar em soluções com viscosidade relativamente baixa nas concentrações e temperaturas de trabalho.⁽⁴⁰⁾

Em colunas de sílica gel, aminas secundárias e terciárias, tais como dietiltilenodiamina ou trietanolamina, podem ser utilizadas como deslocadores, a não ser que a amostra contenha substâncias ácidas. Como regra geral, para evitar associação com componentes da amostra, o deslocador não deve possuir carga contrária aos componentes desta.^(1,39)

Os deslocadores normalmente empregados em colunas de sílica gel quimicamente ligadas a grupos alquila são sais quaternários de alquil ou arilalquil amônio, tais como sais de trimetiloctilamônio, trimetilbenzilamônio ou tetrabutylamônio. Neste tipo de coluna também empregam-se deslocadores neutros, a saber: n-propanol, n-butanol, fenol, 2-butoxietanol, 2-(2-butoxi)etanol e monometileter de dipipilenoglicol.⁽¹⁾

O requisito básico de maior retenção dos deslocadores que qualquer um dos componentes da amostra, no sistema empregado, pode ser estimado de maneira rápida e econômica através de testes de eluição no referido sistema. Informações extras sobre o comportamento dos possíveis deslocadores frente aos componentes da amostra podem ser obtidas através da medição das isotermas de todos os componentes no sistema selecionado.^(1,39,46)

II.2.4 Efeito da Variação dos Parâmetros Operacionais em Cromatografia por Deslocamento

Em aplicações preparativas, uma medida fundamental dos resultados da cromatografia por deslocamento é a recuperação, dada pela porcentagem do componente sob consideração contido em frações sucessivas de efluente a uma dada pureza. No entanto, a eficiência do processo pode ser expressa através da razão de produção, a qual é definida como a quantidade de produto recuperada dividida pela duração da corrida cromatográfica, medida pelo tempo de retenção da frente do deslocador. Frequentemente, pode-se achar condições ótimas para os diversos parâmetros operacionais de maneira a maximizar a razão de produção.⁽¹⁾

Com a disponibilidade atual de colunas recheadas com micropartículas, controladores de vazão de alta sensibilidade e instrumentação de precisão, a facilidade da separação por cromatografia por deslocamento é grandemente afetada por fatores termodinâmicos, tais como: forma das isothermas, adsorvidade relativa dos componentes, solubilidade e concentração relativa dos componentes da mistura. Apesar de as relações fundamentais entre estes fatores terem sido estabelecidas a muito tempo^(47,48), nenhuma expressão analítica pôde ser desenvolvida devido à complexidade matemática das equações diferenciais não lineares envolvidas no modelo.⁽³⁸⁾

Do ponto de vista prático, a otimização do processo é feita selecionando-se condições que requerem o menor período para a obtenção de uma série de deslocamento completamente desenvolvida, isto é, condições que requerem o menor comprimento de coluna para realizar a separação.⁽³⁸⁾

Os principais parâmetros operacionais envolvidos na otimização do processo são: comprimento da coluna, concentração do deslocador, vazão da solução do deslocador, concentração e volume de amostra e temperatura.

O volume é uma propriedade característica da coluna de um dado sistema cromatográfico desenvolvido por deslocamento. Este parâmetro determina se, sob condições operacionais apropriadas, o desenvolvimento será completo e a condição isostática será atingida, ou se o desenvolvimento será interrompido em algum estágio intermediário. No entanto, a um dado diâmetro, o comprimento de coluna é uma medida aceitável e mais conveniente para expressar a quantidade de fase estacionária empregada para uma determinada separação. Desta forma, sob condições operacionais que permitam a obtenção de uma série de deslocamento completamente desenvolvida, pode-se definir o comprimento de coluna mínimo necessário para a separação. Com colunas mais curtas, o desenvolvimento completo não pode ser atingido sem a alteração de outros parâmetros. Se a coluna for mais longa que o valor mínimo estabelecido, a série de deslocamento atravessa o excesso de comprimento sem alteração, na ausência de efeitos secundários, tais como: dispersão axial e equilíbrios químicos secundários entre os componentes. Na prática, no entanto, a movimentação da série de deslocamento através do comprimento

excedente de coluna resulta na diminuição da recuperação e no aumento do tempo de separação.⁽³⁹⁾

Tal como na cromatografia por eluição, onde o comprimento da coluna é, freqüentemente, aumentado visando um maior número de pratos teóricos para assegurar a separação, na cromatografia por deslocamento, o comprimento da coluna também deve ser aumentado para separações mais complexas, ou, no caso particular da cromatografia por deslocamento, quando a quantidade de amostra é aumentada. O aumento da quantidade de amostra permitido pelo uso de uma coluna mais longa, geralmente resulta no aumento das regiões de produtos puros na série de deslocamento. Desta forma, a recuperação de material puro é maior que a obtida com uma amostra menor em uma coluna proporcionalmente mais curta. Porém, para que tal situação ocorra, é necessário que o comprimento de ambas as colunas seja eficientemente utilizado.⁽³⁹⁾

O tamanho de partícula do material utilizado como fase estacionária também é um parâmetro crítico, uma vez que a eficiência da coluna aumenta com a diminuição do diâmetro da partícula, como em cromatografia por eluição. O uso de partículas pequenas, se possível, é vantajoso devido não apenas ao aumento da recuperação do produto puro, mas a vazão relativamente alta que pode ser utilizada, a qual resulta em aumento da razão de produção. Por outro lado, argumentos teóricos predizem um tamanho de partícula mínimo, abaixo do qual nenhuma vantagem é ganha pelo aumento da vazão, pois a eficiência da coluna é efetivamente controlada pela velocidade da cinética de deslocamento na superfície da fase estacionária⁽⁴⁰⁾, a qual não é tão dependente do tamanho de partícula quanto em cromatografia por eluição.

Em experimentos de cromatografia por deslocamento, as concentrações dos componentes na série de deslocamento e o grau e tempo de separação são determinados pela natureza e concentração do deslocador, desde que todos os outros parâmetros sejam mantidos constantes.

A figura II.6 mostra qualitativamente os limites inferior e superior da concentração do deslocador em uma mistura binária hipotética. Conforme pode ser observado, o limite inferior de concentração do deslocador é definido pela linha operacional à esquerda, a qual apenas toca a isoterma do componente menos retido. Utilizando-se concentrações menores deste deslocador, o componente menos retido será eluído da coluna à frente da série de deslocamento. O limite superior de concentração do deslocador é dado pelo limite de solubilidade do componente mais retido, ou seja, pela linha operacional que intersepta este ponto. O uso de concentrações do deslocador mais elevadas deve causar a precipitação deste componente.⁽³⁹⁾

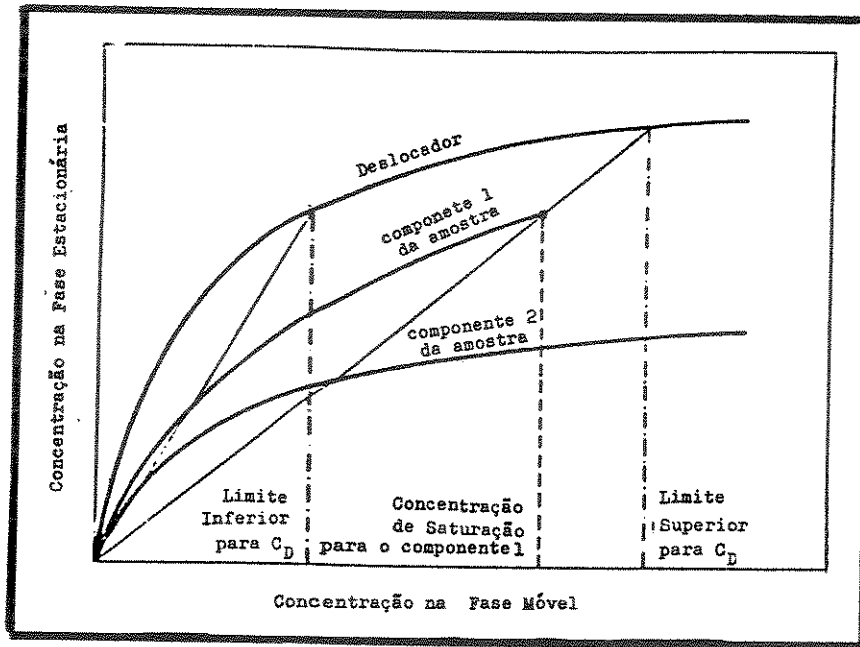


Figura II.6: Limites inferior e superior de concentração do deslocador⁽³⁹⁾

Normalmente, altas concentrações do deslocador reduzem o tempo de separação e aumentam a concentração dos produtos, uma vez que a concentração dos componentes na série de deslocamento completamente desenvolvida aumenta com a concentração do deslocador. A baixas concentrações, a frente do deslocador move-se lentamente através da coluna, resultando em longo tempo de separação e, conseqüentemente, baixa razão de produção. Idealmente, aumentando-se a concentração do deslocador diminui-se o tempo de separação e eleva-se a razão de produção. No entanto, a altas concentrações, além de elevada concentração dos produtos, obtém-se zonas de deslocamentos estreitas para os componentes. Desta forma, ao aumentar-se a concentração do deslocador, eleva-se a mistura devido às limitações de transferência de massa. Conseqüentemente, para sistemas cromatográficos não ideais, tem-se um valor ótimo para a concentração do deslocador, a qual maximiza a razão de produção de um dado componente da amostra.^(39,42)

A vazão da solução do deslocador é um outro parâmetro importante na otimização da razão de produção de uma separação por cromatografia por deslocamento. Conforme foi demonstrado por Hórvath e colaboradores⁽³⁸⁾, em cromatografia por deslocamento, o aumento da vazão, dentro dos limites operacionalmente acessíveis, tem um efeito de diminuição da recuperação. No entanto, os fundamentos deste processo^(36,47) foram baseados em suposições de idealidade, isto é, transferência de massa ou cinética de deslocamento infinitamente rápida e campo de fluxo uniforme, e não prevêem a ocorrência de tais efeitos de vazão. Porém, o comportamento real observado resulta em eficiência de separação dependente da vazão, sendo o efeito desta bastante complicado, uma vez que tanto a vazão quanto o comprimento de coluna influenciam a separação. Normalmente, a eficiência da separação aumenta com a diminuição da vazão devido ao aumento de tempo disponível para o desenvolvimento da série de deslocamento na coluna. Todavia, a diminuição de vazão aumenta a pureza do produto até um dado limite,

pois a diminuição da vazão abaixo do valor no qual a série de deslocamento está completamente desenvolvida não resulta em efeito algum nesta série.^(38,39)

Por outro lado, a diminuição da vazão pode levar à redução da razão de produção devido ao aumento do tempo necessário para a corrida cromatográfica. Recentemente, Cramer e seus colaboradores⁽²⁾ mostraram que a purificação de peptídeos por deslocamento pode ser eficientemente realizada, sob condições apropriadas, a velocidades lineares elevadas com mínimos efeitos adversos na pureza do produto.

Desta forma, existe um valor ótimo de vazão que maximiza a razão de produção. A disponibilidade de meios de redução dos efeitos indesejáveis de resistência à transferência de massa e não uniformidade de fluxo permite a utilização de vazões mais elevadas. Conseqüentemente, a cromatografia por deslocamento se beneficia da utilização de colunas com micropartículas.⁽³⁹⁾

A concentração e o volume de amostras injetadas também são parâmetros importantes na seleção das melhores condições operacionais para uma separação por deslocamento, pois existem valores ótimos destes parâmetros que maximizam a razão de produção.

Em cromatografia por deslocamento o efeito da utilização de uma amostra muito grande é uma série de deslocamento desenvolvida de maneira incompleta, apresentando forma diferente da onda quadrada normalmente encontrada em condições ótimas, e baixa recuperação de produto na forma pura. Por outro lado, o uso de uma quantidade muito baixa de amostra resulta em uma série de deslocamento com zonas estreitas e, conseqüentemente, a recuperação do produto na forma pura também é baixa, pois a superposição de zonas é relativamente alta.^(38,40)

O uso de um grande volume de amostra poderá resultar em uma separação por mistura de mecanismos: análise frontal e deslocamento. Em cromatografia por deslocamento, o estágio de introdução da amostra é, basicamente, um processo de análise frontal, mas este processo é interrompido com o início da entrada do deslocador na coluna. Desta forma, quanto maior o volume da amostra, mais adiantado fica o desenvolvimento por análise frontal e, a um dado valor limite de volume de amostra, o primeiro componente da mistura emerge da coluna antes da entrada do deslocador e tem-se, essencialmente, uma separação por análise frontal. Um mecanismo misto sempre opera no início de qualquer separação por deslocamento, mas com uma coluna suficientemente longa, o processo de desenvolvimento por deslocamento torna-se predominante e atinge-se a condição isostática.⁽³⁸⁾

Na prática, o limite de volume de amostra é importante quando a solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel é baixa. Desta maneira, a um dado volume de amostra, a quantidade de material que pode ser separado em uma corrida cromatográfica

é limitada, entre outros fatores, pela solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel empregada.⁽³⁸⁾

O aumento da razão de produção em cromatografia por deslocamento envolve dois aspectos: melhoria da recuperação e aumento da concentração do produto no efluente. Este último pode envolver um aumento de solubilidade dos componentes na fase móvel. Em processos por deslocamento a temperaturas elevadas ambos aspectos são afetados, de forma que a separação torna-se mais eficiente. O aumento na temperatura reduz significativamente a superposição de bandas e, conseqüentemente, melhora a recuperação de material puro. Este efeito é atribuído a um aumento nos parâmetros de cinética de deslocamento e transferência de massa com a elevação da temperatura.^(2,39)

Outras vantagens do uso de temperaturas elevadas incluem: aumento da solubilidade de todos os componentes e diminuição da viscosidade da fase móvel. A solubilidade é um fator limitante para utilização de cromatografia líquida preparativa e, desta maneira, o uso de temperaturas elevadas é vantajoso em qualquer modalidade de desenvolvimento. A redução da viscosidade do fluido permite o uso de colunas mais longas e vazões mais elevadas, o que por sua vez, resulta num aumento da razão de produção.⁽³⁹⁾

De acordo com o que foi exposto, pode-se concluir que existem valores ótimos para os diversos parâmetros envolvidos em uma separação por deslocamento. Além disso, estes parâmetros são, muitas vezes, interdependentes de modo que a utilização dos valores ótimos individuais nem sempre é possível. Desta maneira, a obtenção de um processo por deslocamento com razão de produção ou pureza de produto maximizada envolve um estudo bastante criterioso dos diversos parâmetros pertinentes.

II.2.5 Equipamentos⁽¹⁾

Na maioria dos trabalhos recentes de cromatografia por deslocamento, empregou-se as mesmas colunas usadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica. Conseqüentemente, a instrumentação convencional de CLAE pode ser modificada facilmente para separações em escala semi-preparativa por cromatografia por deslocamento. Vários destes sistemas encontram-se descritos na literatura.^(5,38,39,44) A figura II.7 apresenta o esquema de uma unidade conjugada composta por um sistema para deslocamento, denominado fracionador, e um cromatógrafo líquido analítico, denominado analisador em linha.

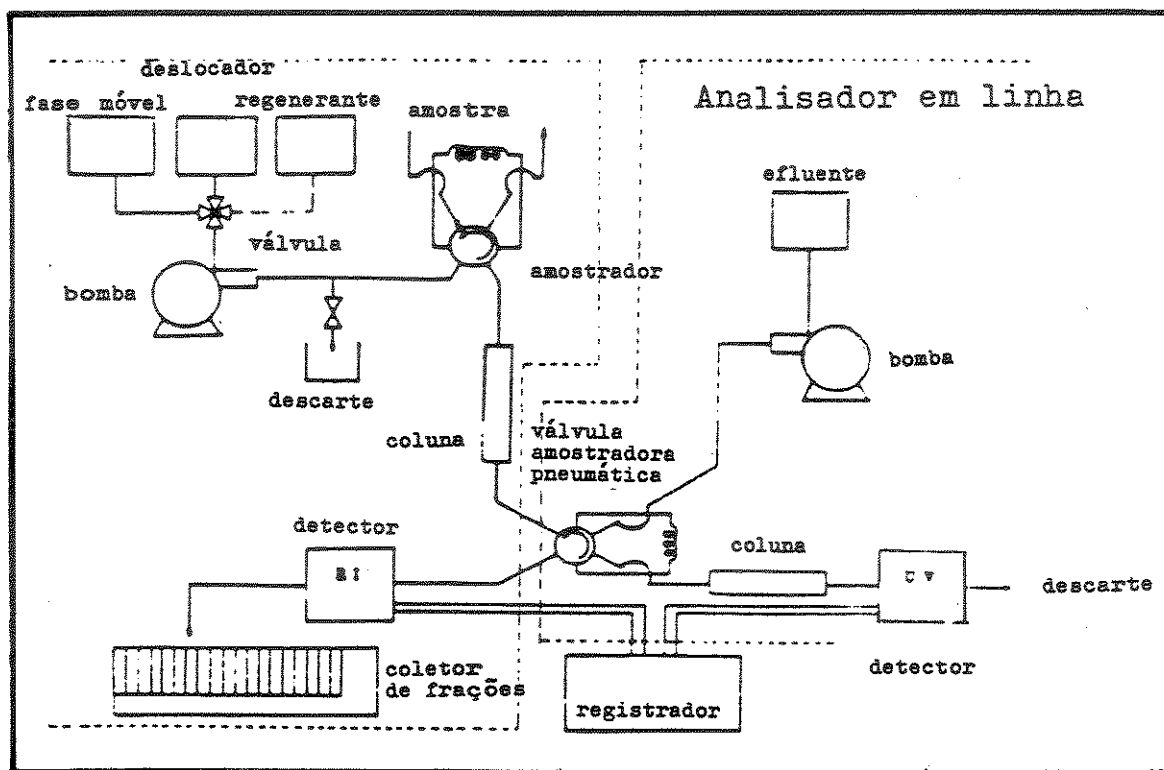


Figura II.7: Esquema de um sistema conjugado: fracionador e analisador em linha, utilizado em cromatografia por deslocamento.⁽¹⁾

O fracionador possui apenas uma bomba para a perfusão seqüencial da coluna com a fase móvel, solução do deslocador e regenerador. A válvula de amostra é similar à empregada em sistemas analíticos, mas possui uma alça com um volume maior, geralmente excedendo um (1) mililitro. O efluente da coluna passa através de uma válvula amostradora do analisador em linha e, então, através da cela de um detector diferencial por índice de refração, antes de entrar no coletor de frações. O detector por índice de refração monitora o efluente da coluna em termos de concentração do produto, mas, em muito casos, não pode ser usado para demarcar as fronteiras entre as zonas adjacentes dos componentes separados, as quais são necessárias para medida de recuperação. Através da amostragem do efluente da coluna em curtos intervalos de tempo, por exemplo a cada 15 ou 30 segundos, o analisador analítico em linha pode fornecer a informação sobre a composição do efluente. Desta forma, as frações contendo os componentes puros ou as frações com misturas devido à superposição de zonas adjacentes podem ser coletadas separadamente. O uso de uma coluna curta, com 3 a 5 centímetros de comprimento, é suficiente para a análise em linha, pois usualmente não há mais de duas substâncias presentes em uma amostra de efluente.

Alternativamente, pode-se coletar pequenas frações de efluente da coluna e submetê-las à análise posterior por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia em camada delgada. O emprego de cromatografia em camada delgada é um meio rápido e eficiente para a análise simultânea de um grande número de frações, de maneira a selecioná-las para recuperação do(s) produto(s) de interesse.

II.2.6 Vantagens e Desvantagens

Em cromatografia preparativa, se a quantidade de amostra injetada é mantida pequena, pode-se conseguir a manutenção da separação obtida em escala analítica utilizando-se condições cromatográficas similares.⁽⁴⁹⁾ No entanto, com a elevação da quantidade de amostra, o tempo de retenção torna-se altamente dependente da concentração da amostra e o formato dos picos torna-se tão distorcido que a recuperação pode ser significativamente reduzida. O uso de cromatografia por deslocamento pode solucionar estes problemas, uma vez que a separação dos componentes da amostra, neste processo, ocorre quando a concentração destes é suficientemente alta para estar na região não linear de suas isotermas de adsorção.⁽⁵⁰⁾

A cromatografia por deslocamento também é recomendada devido à recuperação dos produtos a concentrações significativamente mais elevadas que as obtidas em cromatografia por eluição, o que gera vantagens adicionais de benefícios econômicos e ambientais por baixo consumo de solventes. Na realidade, tanto as fases estacionária e móvel quanto o equipamento são melhor utilizados na cromatografia por deslocamento que no método por eluição. Conseqüentemente, a quantidade de produto puro recuperado por unidade de volume de coluna é normalmente mais elevada em cromatografia por deslocamento que no desenvolvimento por eluição.⁽³⁸⁾

Vantagens adicionais da cromatografia por deslocamento quando comparada à cromatografia por eluição em escala preparativa são:^(38,41,46)

- alta razão de produção;
- facilidade de separação de quantidades relativamente grande de material com retenção próxima;
- minimização de mistura decorrente de formação de cauda de pico, quando do aumento da quantidade de amostra separada;
- facilidade de recuperação do produto devido à alta concentração em que é obtido;
- possibilidade de aplicação de colunas analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa;
- potencialidade do emprego de espaçadores;
- possibilidade de uso de micropartículas de fase estacionária em aplicações preparativas, o que não ocorre em cromatografia por eluição, onde o uso de

micropartículas em colunas com grande diâmetro resulta em problemas mecânicos associados com a operação a altas pressões na entrada da coluna.

No entanto, um dos maiores impecilios à ampla aplicação desta técnica é a indisponibilidade de métodos práticos que permitam a seleção e otimização do deslocador, após a escolha da fase estacionária a ser utilizada. A maior complexidade deste método é uma dificuldade adicional.^(40,43,46)

A necessidade de regeneração da coluna para a remoção do deslocador é uma desvantagem significativa da cromatografia por deslocamento quando comparada à eluição isocrática, apesar de que esta desvantagem desaparece se necessita-se utilizar eluição por gradiente em escala preparativa. De qualquer maneira, a regeneração da coluna está associada com uma limpeza geral do sistema e a remoção de contaminantes que poderiam vir a se acumular.⁽³⁸⁾

A técnica de deslocamento requer que as isotermas dos componentes e do deslocador, no sistema selecionado, sejam do tipo langmuiriano, para que se obtenham zonas da série de deslocamento com o mínimo de superposição e contaminação dos componentes individuais. Porém, mesmo nestas condições, e com a utilização de colunas altamente eficientes em termos de dispersão axial, a separação entre as zonas ainda envolve uma certa mistura de produtos. Desta forma, na recuperação de produtos da região de fronteira entre as zonas, preferencialmente, coleta-se frações separadas que são submetidas à nova separação cromatográfica sem necessidade de concentração prévia.

Outras desvantagens da cromatografia por deslocamento são:⁽⁴³⁾

- custo do deslocador, o que muitas vezes acarreta na necessidade de seu reciclo;
- dificuldade de demarcação das zonas adjacentes por detecção direta, implicando na análise em um sistema analítico auxiliar ou na análise posterior de pequenas frações coletadas;
- a exigência de alta solubilidade dos componentes da amostra e do deslocador na fase móvel selecionada, para que a técnica possa ser explorada em toda a sua potencialidade.

De acordo com o que foi exposto, pode-se concluir que a opção por um ou outro método de desenvolvimento cromatográfico depende muito das características específicas da amostra a ser separada, assim como da comparação dos custos envolvidos no tratamento para concentração dos produtos purificados em cromatografia por eluição, e no custo de recuperação do deslocador no processo por deslocamento, além do consumo de fases estacionária e móvel.

II.2.7 Exemplos de Aplicações

Serão apresentados, a seguir, alguns exemplos de separação, onde a técnica de cromatografia por deslocamento foi utilizada com sucesso na purificação de compostos. O objetivo deste capítulo não é traçar um perfil condensado de todos os tipos de compostos separados por esta técnica, mas apenas ilustrar a potencialidade de aplicação da mesma em escala preparativa.

A separação de uma mistura de ácidos hidroxifenilacéticos por cromatografia por deslocamento em coluna Partisil ODS-2 10 μm (250 x 4,6 mm) encontra-se representada na figura II.8. A fase móvel empregada foi tampão fosfato 0,1 M, pH 2,12, e o deslocador foi n-butanol 0,87 M. A vazão do deslocador utilizada foi 0,05 ml/min e a temperatura era de 25°C. A amostra foi injetada em um volume de 1,5 ml, contendo 30, 35 e 45 mg de ácido 3,4-diidroxi, 4-hidroxi e 2-hidroxifenilacético, respectivamente. O volume de cada fração coletada era de 0,15 ml e o volume total de efluente foi de 12 ml. Nestas condições, a fração dos componentes recuperada na forma pura foi de 95% para o ácido 3,4-diidroxi, 83% para o ácido 4-hidroxi e 73% para o ácido 2-hidroxifenilacético.⁽³⁸⁾

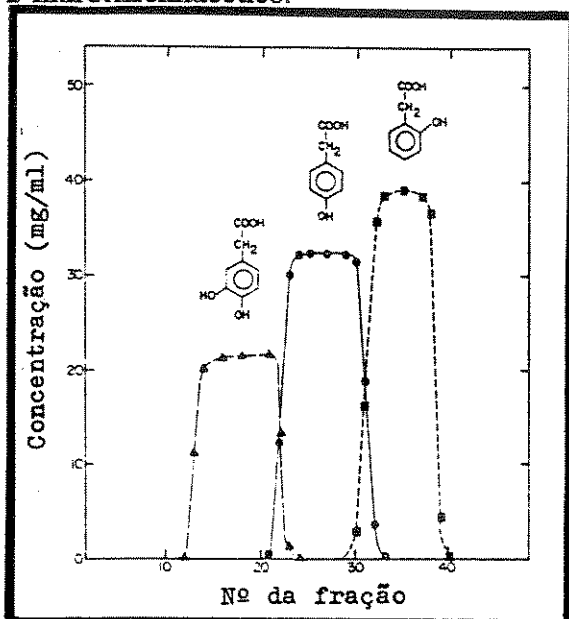


Figura II.8: Separação de uma mistura de ácidos hidroxifenilacético por deslocamento. Fase estacionária: Partisil ODS-2 10 μm (250 x 4,6 mm). Fase móvel: tampão fosfato 0,1 M-pH 2,12. Deslocador: n-butanol 0,87 M. Vazão: 0,05 ml/min. Temperatura 25°C.⁽³⁸⁾

A separação de uma mistura de antibióticos polimixínicos em coluna Lichrosorb RP-8 5 μm (250 x 4,6 mm) pela técnica de deslocamento é apresentada na figura II.9. A fase móvel utilizada foi água contendo 10% (v/v) de acetonitrila e o deslocador foi cloreto de octildodecildimetilamônio 0,05 M na fase móvel. O volume de amostra injetado foi 1,5 ml, o qual continha 150 mg de sulfato de polimixina B. A vazão empregada foi 0,1 ml/min, a uma temperatura de 23°C. Coletou-se frações de 0,5 ml que foram, posteriormente, analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A regeneração da coluna foi feita com metanol.⁽⁵¹⁾

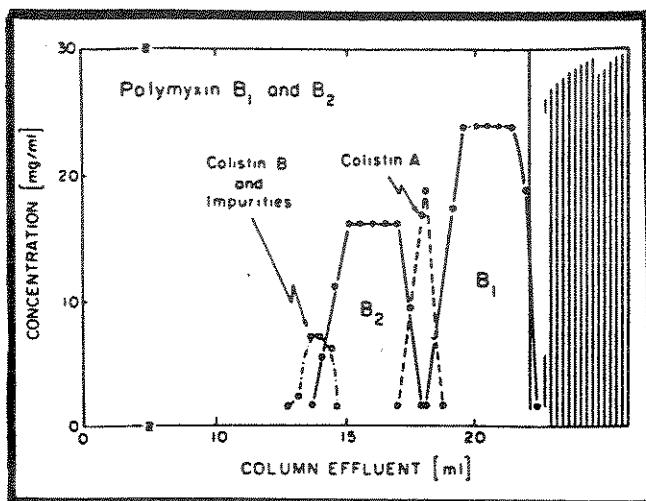


Figura II.9: Separação de uma mistura de uma mistura de antibióticos polimixínicos por deslocamento. A zona achuriada do diagrama representa o deslocador. Fase estacionária: Lichrosorb RP-8 5 μ m (250 x 4,6 mm). Fase móvel: acetonitrila/água 1:9 (v/v). Deslocador: cloreto de octildodecildimetilamônio 0,05 M na fase móvel. Vazão: 0,1 ml/min. Temperatura: 23°C. ⁽⁵¹⁾

O diagrama da separação de uma mistura de corticoesteróides por deslocamento em coluna de sílica gel Partisil 5 μ m (500 x 4,6 mm) é representado na figura II.10. A figura II.11 apresenta a fórmula estrutural destes compostos. A fase móvel usada foi clorofórmio e o deslocador 5% (v/v) dietiletanodiamina em clorofórmio. A vazão empregada foi de 0,1 ml/min e a amostra continha 30 mg de cada um dos componentes em 1 ml de fase móvel. Frações de 0,2 ml foram coletadas para análise posterior por cromatografia líquida de alta eficiência. ⁽⁵⁾

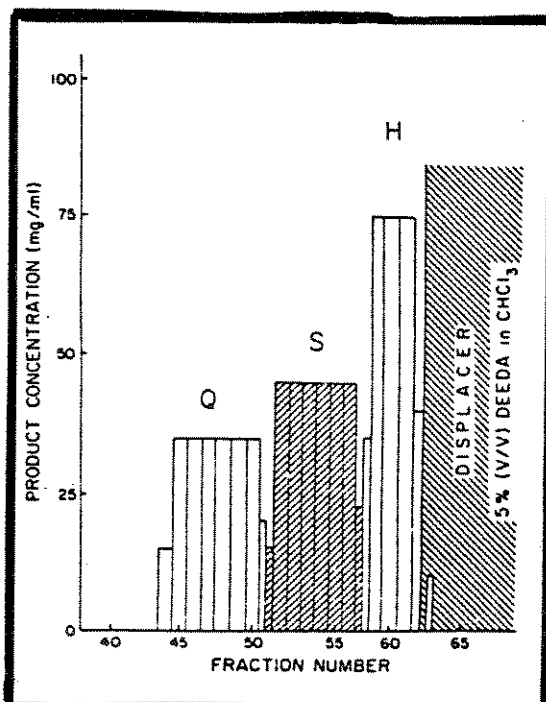
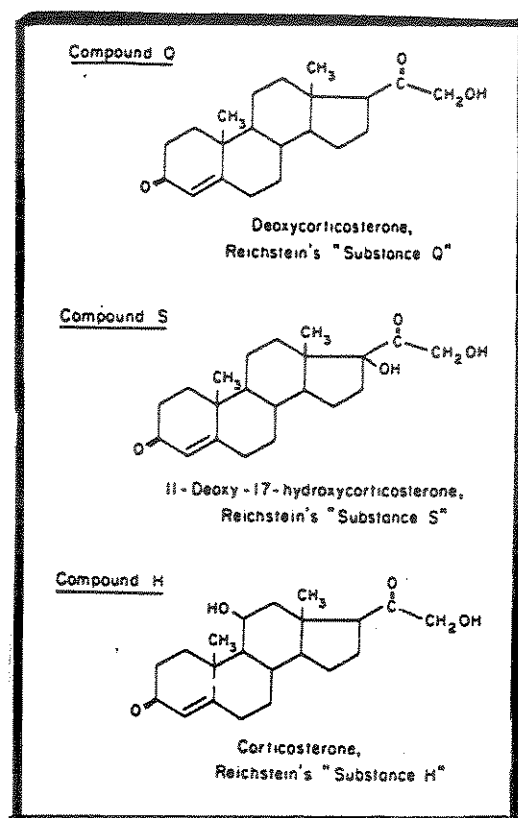


Figura II.10: Separação de uma mistura de corticoesteróides por cromatografia por deslocamento. Fase estacionária: Partisil 5 μ m (500 x 4,6 mm). Fase móvel: clorofórmio. Deslocador: 5% (v/v) dietiletanodiamina na fase móvel. Vazão: 0,1 ml/min. ⁽⁵⁾

Figura II.11: Fórmula estrutural dos corticosteróides cuja separação por deslocamento encontra-se representada na figura II.10.⁽⁵⁾



A figura II.12 apresenta o diagrama da separação de uma mistura de nucleotídeos, em escala preparativa, por cromatografia por deslocamento. A separação de inosina, desoxiinosina, adenosina e desoxiadenosina foi realizada em coluna Supelcosil LC-18 5 μm [(250 x 4,6 mm) + (150 x 4,6 mm)], utilizando-se tampão 10 mM de acetato como fase móvel. O deslocador empregado foi uma solução 27,5 mM de cloreto de benziltributilamônio na fase móvel, a uma vazão de 0,1 ml/min. A amostra a ser separada continha 10 mg de cada componente em 2,0 ml de fase móvel e o experimento foi realizado a 22°C. O diagrama foi construído a partir da análise de frações de 100 μl do efluente da coluna por cromatografia líquida de alta eficiência.⁽³⁹⁾

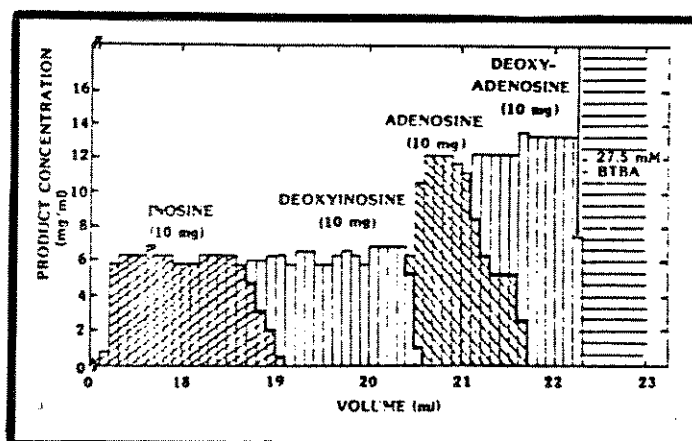


Figura II.12: Separação de uma mistura de nucleotídeos por cromatografia por deslocamento. Fase estacionária: Supelcosil LC-18 5 μm [(250 x 4,6 mm) + (150 x 4,6 mm)]. Fase móvel: tampão 10 mM de acetato. Deslocador: 27,5 mM de cloreto de benziltributilamônio na fase móvel. Vazão: 0,1 ml/ml. Temperatura: 22°C.⁽³⁹⁾

A análise da figura II.12 mostra que pôde-se obter uma separação razoável dos 40 mg de mistura de nucleotídeos por deslocamento, empregando-se colunas de dimensões analíticas.⁽³⁹⁾

A separação de uma mistura de proteínas por cromatografia por deslocamento, empregando coluna trocadora de cátions Mono S (50 x 5 mm) 10 μ m, encontra-se representada na figura II.13. A fase móvel utilizada foi solução 0,1 M de sulfato de amônio em tampão fosfato pH 7,5 e o deslocador foi 30 mg/ml de Nalcolyte 7105 na fase móvel, a uma vazão de 0,1 ml/min. A amostra consistiu de 500 μ l de uma solução 1,67 mg/ml de cada um dos componentes: α -quimotripsogênio, citocromo C e lisosina. A separação foi realizada a 22°C e o efluente foi coletado em frações de 100 μ l para análise posterior.⁽⁵²⁾

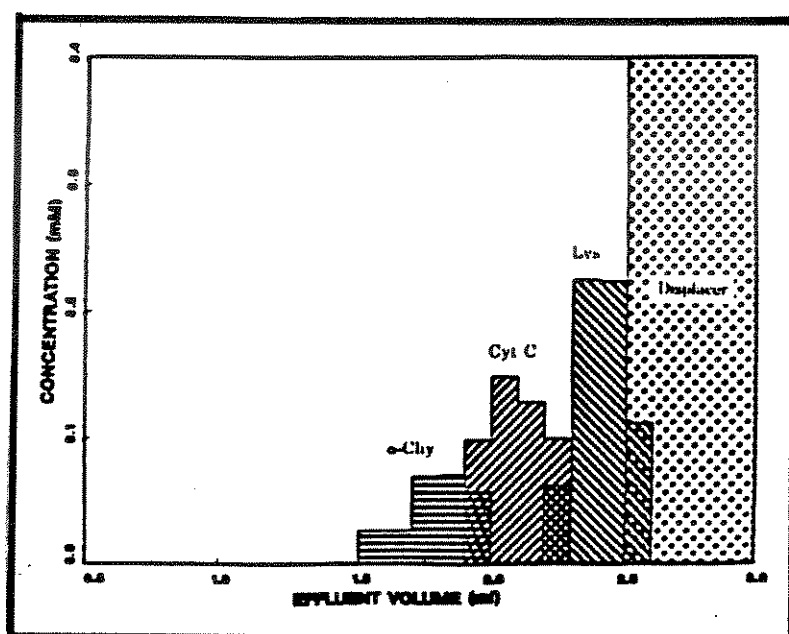


Figura II.13: Separação de uma mistura de proteínas por cromatografia por deslocamento, α -chy = α -quimotripsogênio, cyt C = citocromo C e lys = lisosina. Fase estacionária: Mono S (50 x 5 mm) 10 μ m. Fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M em tampão fosfato pH 7,5. Deslocador: Nalcolyte 7105-30 mg/ml na fase móvel. Vazão: 0,1 ml/min. Temperatura: 22°C.⁽⁵²⁾

A figura II.14 apresenta o histograma da purificação de 9,0 g de uma mistura de peptídeos sintéticos em coluna Lichropep RP-18 25-40 μ m (260 x 40 mm) por deslocamento. A fase móvel utilizada foi ácido trifluoroacético 0,1% em água e o deslocador foi cloreto de benziltributilamônio 50 mM na fase móvel a uma vazão de 8 ml/min. A recuperação do fragmento 163-171 da interleucina β humana (L-1 β) foi de 81,8%. Deve-se atentar para o fato que, enquanto a maioria das aplicações de cromatografia por deslocamento está restrita à purificação de centenas de miligramas de amostra^(5,38,39,51,52), este exemplo mostra a aplicação da técnica à purificação de algumas gramas de amostra.⁽⁵³⁾

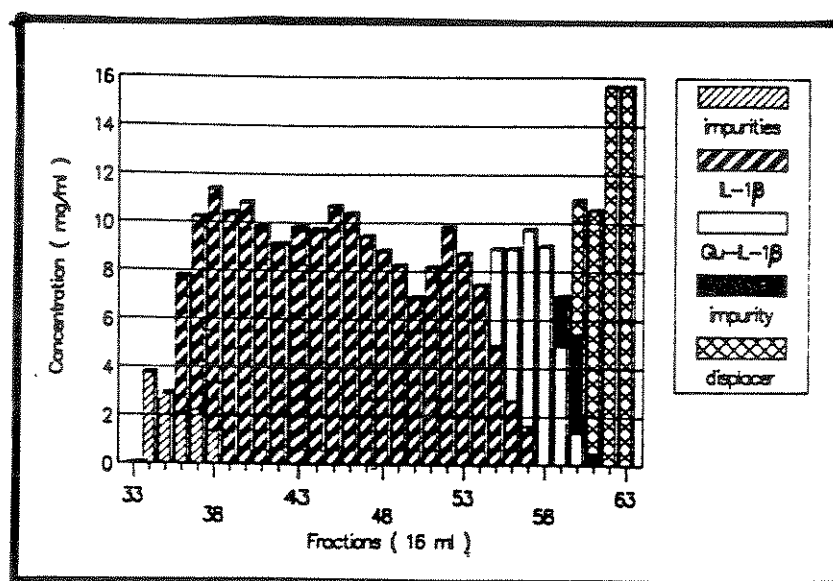


Figura II.14: Purificação de fragmento 163-171 da interleucina β humana (L-1 β) por cromatografia por deslocamento. Fase estacionária: Lichropep RP-18 25-40 μm (260 x 40 mm). Fase móvel: 0,1% de ácido trifluoroacético em água. Deslocador: 50 mM de cloreto de benziltributilamônio na fase móvel. Vazão: 8 ml/min.⁽⁵³⁾

II.2.8 Perspectivas

Após estabelecer-se como uma técnica analítica das mais versáteis, a cromatografia líquida de alta eficiência vem gozando de uma importância crescente como um processo de separação preparativo e, até mesmo industrial, principalmente devido à demanda atual de processos em biotecnologia.

Apesar de bastante vantajosa em aplicações analíticas, a cromatografia por eluição apresenta algumas desvantagens quando empregada para fins preparativos, a saber: não utilização de toda capacidade da fase estacionária, consumo elevado de solvente (10 a 20 vezes maior que a cromatografia por deslocamento) e alto custo da recuperação do produto do efluente devido à diluição inerente ao processo.

Por outro lado, a potencialidade de aplicação da cromatografia por deslocamento em processos preparativos, nos últimos anos, vem sendo bastante explorada. Os resultados mostram-se promissores, podendo-se usar colunas convencionalmente analíticas, em escala semi-preparativa e obtendo-se os produtos em concentrações bastante elevadas. Esta vantagem singular de possibilidade de concentração da amostra, durante a separação, faz desta técnica um processo bastante atraente para uso em conjunto com um reator químico, onde os componentes não reagidos do meio são separados e reciclados ao reator. No campo analítico, a cromatografia por deslocamento também pode ser empregada como um meio eficiente de concentração de amostras.

No entanto, a ampla aplicação da técnica de cromatografia por deslocamento ainda está restrita pela falta de grande número de exemplos descritos detalhadamente em literatura, pela dificuldade e relutância de aceitação da cromatografia não-linear e pelos problemas associados com a adaptação de um novo modo de separação cromatográfica.

O conhecimento das isotermas de adsorção e solubilidades dos componentes da amostra e dos deslocadores em potencial facilita bastante a seleção das condições operacionais, uma vez que se utilize a teoria que descreve as propriedades de uma série de deslocamento completamente desenvolvida e tenha-se um entendimento qualitativo dos fatores envolvidos no desenvolvimento do processo que resultará em separação. O emprego recente de cromatografia de alta eficiência com desenvolvimento por análise frontal para a medição rápida de isotermas, com um consumo mínimo de soluto, oferece um meio conveniente para a obtenção das isotermas, tornando a aplicação da técnica de deslocamento bem mais acessível.

De um modo geral, a expectativa é que a intensa competição comercial, juntamente com um alto nível de atividades de pesquisa, irão continuar trazendo um desenvolvimento rápido da cromatografia preparativa e que, neste contexto, a cromatografia por deslocamento poderá começar a ser explorada em toda a sua potencialidade.

II.3 Métodos de Medição de Isotermas Aplicados à Cromatografia por Deslocamento

II.3.1 Introdução^(45,54 e 57)

Os processos de separação por cromatografia são governados pela adsorção ou absorção do soluto a partir de uma solução. No estado de equilíbrio, o fenômeno de sorção é normalmente representado pela isoterma de sorção que relaciona a concentração do soluto na fase móvel com a concentração do mesmo na fase estacionária, no intervalo de concentração desejado.

As isotermas de adsorção há muito vêm sendo estudadas pelos físico-químicos, objetivando a investigação das interações entre o soluto e uma superfície. Mais recentemente, no entanto, as isotermas ganharam maior relevância e passaram a ser estudadas também por sua potencialidade de aplicação nos estudos teóricos de simulação do perfil de eluição de misturas, assim como pela possibilidade da aplicação prática na otimização das condições experimentais em cromatografia preparativa.

Tradicionalmente, as isotermas eram medidas por métodos estáticos, nos quais mede-se a mudança na concentração do soluto após a adição do adsorvente à solução. A partir destes valores calcula-se pontos discretos da isoterma do mesmo. As maiores desvantagens desta técnica são a lentidão e a incerteza do atingimento do estágio de

equilíbrio, assim como a grande quantidade de soluto e adsorvente necessários a uma medição precisa. No caso da utilização de adsorventes não polares, tem-se, ainda, a dificuldade adicional de estes não serem facilmente umidecidos por solventes ricos em água, o que agrava os problemas experimentais envolvidos na medição de isothermas pelo método estático. Além disso, a medição de pequenas alterações de concentração, quando a solução é muito diluída, ou quando o sistema contém apenas espécies com baixa retenção, pode apresentar baixa precisão.

Com o objetivo de superar as dificuldades inerentes ao método estático de medição de isothermas, foram desenvolvidos métodos cromatográficos baseados em colunas recheadas. Tais métodos apresentam as vantagens de serem mais rápidos e precisos. Também encontram-se descritos na literatura^(59,60) métodos numéricos que baseiam-se em um número mínimo de medidas cromatográficas e no modelo ideal de cromatografia. Alguns destes métodos serão descritos de forma bem sumarizada. A seguir, dar-se-á ênfase aos métodos do tempo de retenção e de análise frontal, os quais foram empregados na medição das isothermas de adsorção dos compostos digitálicos utilizados.

II.3.2 Modelo de Lagmuir

Um grande número de teorias⁽⁵⁴⁾ têm sido propostas para descrever o fenômeno de adsorção baseadas no comportamento do adsorbato, no processo físico de adsorção e/ou na forma da isoterma. O modelo de Langmuir é, normalmente, um bom modelo para correlacionar dados experimentais de isothermas individuais.

A isoterma de Langmuir relaciona a concentração do soluto em equilíbrio na fase estacionária, C_s , e na fase móvel, C_M e, no caso de componentes individuais, é descrita pela seguinte equação:

$$C_s = \frac{aC_M}{1 + bC_M} \quad (\text{II.12})$$

onde a e b são parâmetros característicos do soluto em um dado sistema de fase estacionária/fase móvel. O parâmetro a representa a inclinação inicial da isoterma e o b a constante termodinâmica de ligação.

Dados de literatura⁽⁵⁴⁾ apontam que a equação II.12 correlaciona bem os dados de adsorção de vários solutos de soluções aquosas para adsorventes com fases quimicamente ligadas. De acordo com esta equação, C_s atinge um valor máximo a/b a concentrações de soluto suficientemente altas. Esta relação é comumente denominada capacidade de saturação da coluna, assumindo a formação de uma monocamada.

O modelo de Langmuir descreve uma isoterma que apresenta uma região linear inicial (baixas concentrações) que obedece ao comportamento de adsorção descrito pela

Lei de Henry e, a altas concentrações, uma região de platô, na qual a quantidade de soluto adsorvido na fase estacionária permanece constante.

Para um sistema multi-componente, a isoterma do componente i é dada pela seguinte equação:

$$C_{S_i} = \frac{a_i C_{M_i}}{1 + \sum_j b_j C_{M_j}}, \quad j = 1, 2, \dots, n \quad (\text{II.13})$$

onde a_i e b_i são os parâmetros para a espécie i e n é o número de componentes da mistura. Broughton⁽⁶¹⁾ mostrou que o uso dos mesmos parâmetros nas equações II.12 e II.13 viola a relação de Gibbs-Duhem, a menos que a_i/b_i seja o mesmo para todos os componentes. Uma vez que, em geral, esta condição não é satisfeita para sistemas reais, os parâmetros das isotermas individuais podem não representar exatamente a realidade quando utilizados na equação II.13. Desta forma, foram desenvolvidos métodos experimentais que permitem a determinação dos parâmetros a_i e b_i de medições com sistemas multi-componentes, os quais evitam o uso dos parâmetros da isoterma individual em sistemas multi-componentes.

A importância de medir-se isotermas multi-componentes ou competitivas deve-se ao fato que as altas concentrações de solutos utilizadas nas separações em grande escala fazem com que a interferência entre os componentes da mistura seja significativa. Conseqüentemente, a quantidade adsorvida de um componente depende da concentração de todos os compostos presentes na solução. Desta maneira, a influência dos outros componentes da mistura na quantidade de um dado soluto adsorvido no estado de equilíbrio é importante e pode ter uma influência negativa no grau de separação que pode ser atingido em cromatografia preparativa.

O modelo de Langmuir tem sido amplamente empregado para correlacionar os dados obtidos de experimentos de adsorção líquido-sólido. Porém, este modelo vem sendo criticado devido à sua restrição a superfícies homogêneas e à formação de uma monocamada de soluto. No entanto, os modelos alternativos propostos^(62,63) resultam em isotermas mais complexas, que requerem a coleta de um maior número de dados experimentais para a avaliação dos parâmetros, não satisfazem alguns dos princípios da teoria de cromatografia e não possuem a base física da isoterma de Langmuir, o que justifica a grande aplicação desse modelo na correlação de dados de adsorção.

II.3.3 Métodos de Medição de Isotermas Individuais^(54,55,57,58,63)

Conforme citado anteriormente, o método estático de medição de isotermas envolve vários problemas de ordem empírica e, portanto, limitar-se-á esta discussão aos métodos cromatográficos para obtenção de isotermas individuais.

Os dois métodos cromatográficos mais comuns de medição de isotermas individuais envolvem uma mudança discreta na concentração do soluto na entrada da coluna, de maneira a aumentar ou diminuir o valor desta. Quando a concentração é elevada, obtém-se uma frente bem demarcada no final da coluna, conforme figura II.15, enquanto a diminuição da concentração resulta numa curva com a aparência difusa da cauda de um pico cromatográfico (figura II.16). As diferenças no formato das curvas, resultantes do aumento e diminuição da concentração do soluto, são resultantes da tendência à afinação do pico na primeira e da natureza difusa da segunda. Conforme observado por DeVault⁽⁴⁷⁾, isotermas côncavas sempre exibem tal comportamento e, no caso de cromatografia ideal, sem o alargamento de bandas, a frente mantém uma forma quadrada à medida que percorre a coluna. Em sistemas reais, a frente assume uma forma sigmoidal, como mostrado na figura II.15, quando um estado de equilíbrio é estabelecido entre o efeito de auto-afinação e de dispersão axial, um processo que tende ao alargamento da frente. O efeito da dispersão axial devido à resistência à transferência de massa e à má distribuição do fluxo é menos aparente na curva difusa de diminuição da concentração mas também afeta o formato desta.

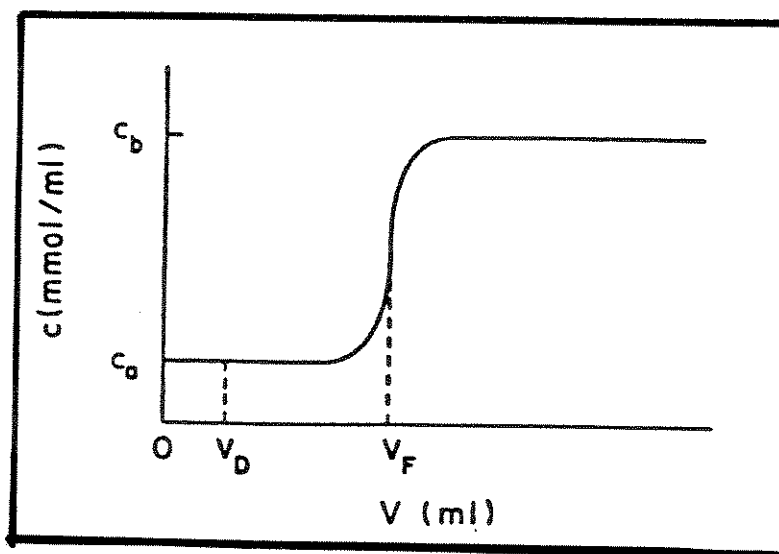


Figura II.15: Curva obtida com a elevação da concentração do soluto de C_a para C_b (análise frontal)⁽⁵⁴⁾.

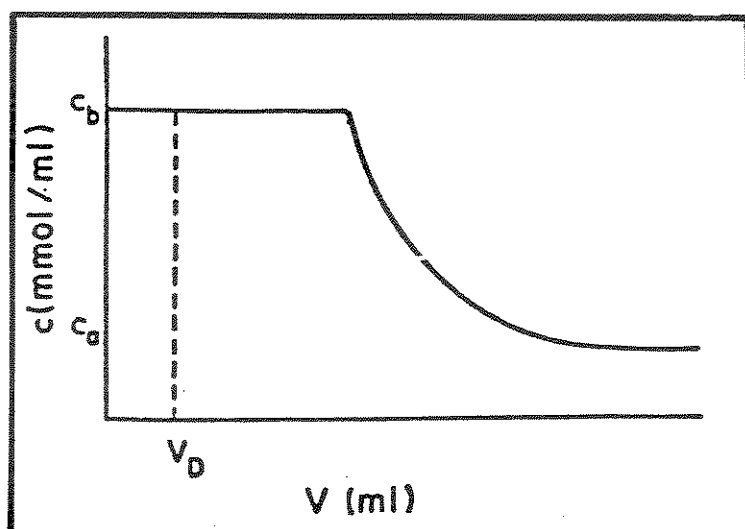


Figura II.16: Curva obtida com a diminuição da concentração do soluto de C_b para C_a (análise frontal por ponto característico)⁽⁵⁴⁾.

O método que emprega um aumento de concentração do soluto, gerando uma frente bem nítida é denominado análise frontal (FA) e, através da aplicação de um balanço de massa, fornece a concentração na superfície, C_s , em equilíbrio com a concentração do soluto na fase móvel, C_M . Portanto, um experimento, como o representado na figura II.15, fornece um ponto da isoterma.

No segundo método, denominado análise frontal por ponto característico (FACP), calcula-se a isoterma inteira a partir da curva apresentada na figura II.16. Neste método, a aplicação de um balanço de massa diferencial resulta na seguinte equação:

$$C_{S(c)} = \frac{1}{V_{sp}} \int_{C_a}^C (V - V_D) dC_M \quad (\text{II.14})$$

onde a concentração do soluto C_s , é alterada de C_a a C , C_s é a concentração do soluto na superfície no equilíbrio, V_{sp} é o volume de adsorvente na coluna, V é o volume de efluente e V_D é o volume da fase móvel no sistema.

A equação II.14 governa a determinação da isoterma pelo método FACP. Uma vez que nesta medição o sinal do detector deve ser convertido em unidades de concentração, para avaliar-se a equação II.14, necessita-se realizar a calibração do detector. Uma outra desvantagem do método FACP é que não são realizadas correções para o espalhamento da banda, o qual alarga a curva difusa representada na figura II.16. O método de análise frontal (FA), por depender apenas da medição precisa do tempo de retenção da frente, é menos suscetível a erros deste tipo.

O método de análise frontal (FA) relaciona a velocidade da frente de concentração resultante de um aumento discreto na concentração do soluto ao valor da isoterma de adsorção do soluto a concentrações elevadas. A figura II.15 mostra a curva do efluente após a elevação da concentração de C_a para C_b e, o balanço de massa integral mostra que a concentração do soluto na fase estacionária em equilíbrio com C_b é dada pela seguinte expressão:

$$C_S(C_b) = C_S(C_a) + [(C_b - C_a)(V_F - V_D)] / V_{sp} \quad (\text{II.15})$$

onde $C_S(C_a)$ é a concentração do soluto na fase estacionária em equilíbrio com C_a

V_F é o volume de retenção da frente

V_D é o volume da fase móvel do sistema, obtido através do produto do tempo de retenção da fase móvel, t_M , pela vazão da fase móvel, $F(V_D = t_M F)$

V_{sp} é o volume de adsorvente na coluna, obtido através das equações II.16 e II.17.

$$V_{sp} = (1 - \varepsilon) V_{col} \quad (\text{II.16})$$

$$\varepsilon = t_M F / V_{col} \quad (\text{II.17})$$

onde ε = porosidade da coluna

V_{col} = volume da coluna ($V_{col} = \pi d^2 L / 4$)

t_M = tempo de retenção da fase móvel

F = vazão da fase móvel

d = diâmetro da coluna

L = comprimento da coluna

Repetindo-se este procedimento para concentrações sucessivamente mais elevadas, obtém-se pontos discretos adicionais da isoterma do composto em estudo.

O método de análise frontal é amplamente empregado na obtenção de isotermas de adsorção individuais por ser um método conveniente, rápido e preciso. Uma outra vantagem deste método é que ele fornece pontos discretos da isoterma e não, necessariamente, a equação da isoterma com as limitações inerentes ao modelo de adsorção empregado.

No entanto, a técnica de análise frontal (FA) possui como desvantagem, comparada à análise frontal por ponto característico (FACP), o grande consumo de soluto. Recentemente, Jacobson et al.^(54,64) desenvolveram uma técnica de análise frontal para medição de isotermas de adsorção individuais ou competitivas através de um sistema de cromatografia líquido miniaturizado. O uso deste sistema, juntamente com o emprego de colunas com diâmetros internos reduzidos ("narrow bore"), permite a medida de isotermas com apenas poucos miligramas da substância de interesse, resolvendo, assim, o problema do método de análise frontal convencional.

As técnicas de FA e FACP são os principais métodos dinâmicos de medição de isotermas individuais, apesar de existirem outras técnicas com aplicação mais restrita, devido às dificuldades operacionais, que são usadas ocasionalmente. Diversos métodos similares à FACP foram desenvolvidos e baseiam-se no uso da equação II.14, mas determinam $C_M(V)$ de maneira diversa, incluindo a Eluição por Ponto Característico (ECP), introduzida por Cremer e Huber⁽⁶⁸⁾ e a Eluição em Platô (EP) de Reilley et al.⁽⁶⁸⁾ A ECP é idêntica à FACP, sendo que uma quantidade limitada de soluto é injetada de forma a originar um pico de eluição, ao invés de ter-se a diminuição na concentração de um platô. Aplica-se, então, a equação II.14 na porção final do pico. A vantagem desta técnica é a pequena quantidade de amostra necessária, mas a mesma apresenta desvantagens idênticas à FACP. No método de eluição em platô (EP) a coluna é equilibrada com uma solução a uma dada concentração e o volume de retenção de uma perturbação desta concentração é medido, resultando em $V(C_M)$ que pode ser tratado de maneira análoga a $C_M(V)$. Desta maneira, não se necessita da calibração do detector e a imprecisão associada ao alargamento da banda em FACP é bastante reduzida. Todavia, os problemas de detecção comuns aos equipamentos de CLAE a altas concentrações podem ser significativos, o tamanho da perturbação pode influenciar a precisão da medida, o consumo de soluto é substancial e a complexidade experimental é maior que a associada à técnica de análise frontal. Uma variação do método de EP emprega uma marcação isotópica do soluto para gerar a perturbação, o que simplifica consideravelmente a análise e elimina a imprecisão associada à magnitude da perturbação da concentração. Porém, os problemas envolvidos na busca de uma forma isotopicamente marcada do soluto e na detecção desta na presença do soluto sem marcação causa limitação na aplicação desta técnica.

Além dos métodos descritos, que são fundamentalmente empíricos, existem métodos para a medição de isotermas baseados na solução das equações que descrevem o comportamento cromatográfico (métodos analíticos) e métodos numéricos. Estes métodos são geralmente baseados num número mínimo de dados experimentais, mas envolvem maior complexidade no tratamento matemático da teoria de cromatografia. Exemplos de tais métodos são: o método do tempo de retenção⁽⁵⁹⁾, descrito a seguir, e o método numérico proposto por Jönsson e Lökvist⁽⁶⁴⁾, que envolve o cálculo da isoterma de adsorção a partir da forma de um pico cromatográfico na presença de efeitos significativos de dispersão (cromatografia não-linear, não-ideal). A grande desvantagem dos métodos analíticos é que para solução das equações, muitas vezes, são feitas aproximações que reduzem significativamente a possibilidade de aplicação dos mesmos a sistemas de interesse. Porém, quando comparados às soluções numéricas, os métodos analíticos possuem a vantagem de prever precisamente os efeitos de alterações simultâneas em diversos parâmetros e de dar uma relação exata entre as principais características da banda de eluição e os parâmetros da separação cromatográfica.

Recentemente, Guiochon e colaboradores⁽⁵⁸⁾ propuseram uma solução analítica para o modelo ideal de cromatografia. Esta solução prevê as bandas de eluição de qualquer amostra de um componente injetada na coluna, desde que a isoterma de adsorção seja langmuiriana e a fase móvel seja um solvente puro ou contenha outros solventes ou aditivos que sejam retidos menos intensamente que o composto em estudo (os fatores de

capacidade da coluna a diluição infinita dos outros solventes ou aditivos do solvente fraco puro são mais de 5 vezes menores que o do composto estudado). As propriedades desta solução permitem escalonar as bandas num gráfico adimensional. É possível definir-se um sistema de coordenadas reduzidas no qual a banda de eluição dependa exclusivamente do fator de carregamento. Estes gráficos podem, então, ser usados para a determinação dos melhores valores dos parâmetros da isoterma de Langmuir, os quais aproximam de maneira mais adequada o comportamento de equilíbrio do composto sob estudo.

Empregando-se a solução proposta por Guiochon⁽⁵⁸⁾, obtém-se a isoterma de adsorção individual do composto por um método denominado método do tempo de retenção.⁽⁴⁵⁾

A partir do tempo de retenção, $t_{R,0}$, de um pico extremamente pequeno do composto (injeção em escala analítica), pode-se calcular o primeiro coeficiente, a , da isoterma de Langmuir através da seguinte expressão:

$$a = \frac{1}{f} \left(\frac{t_{R,0} - t_M}{t_M} \right) \quad (\text{II.18})$$

onde t_M é o tempo de retenção da fase móvel (composto não retido) e f é a razão de fases obtida a partir da equação II.19.

$$f = (1 - \varepsilon) / \varepsilon \quad (\text{II.19})$$

onde ε representa a porosidade da coluna obtida da equação II.17.

O fator de carregamento, L_f , correspondente à quantidade de amostra injetada, pode ser obtido do tempo de retenção da frente de uma amostra grande (eluição em grande escala), empregando-se o gráfico adimensional mostrado na figura II.17. Uma amostra "grande" é definida como uma amostra tal que a forma do pico originado é aproximadamente triangular com uma frente quase vertical bem definida. O fator de carregamento deve ser pelo menos 1% ($L_f = 0,01$).

A partir do valor obtido para a ordenada do gráfico, y , da figura II.17 e, conhecendo-se a eficiência da coluna medida com relação ao composto analisado, obtém-se L_f e calcula-se o valor do parâmetro b da isoterma de Langmuir através das seguintes equações:

$$y = \frac{t_R - t_M}{t_{R,O} - t_M} \quad (\text{II.20})$$

$$L_f = \frac{N_m \cdot b}{F(t_{R,O} - t_M)} \quad (\text{II.21})$$

onde t_M é o tempo de retenção da fase móvel (composto não retido), t_R é o tempo de retenção de uma injeção em grande escala, $t_{R,O}$ é o tempo de retenção de uma injeção em escala analítica, N_m é o número de moles do soluto e F é a vazão da fase móvel.

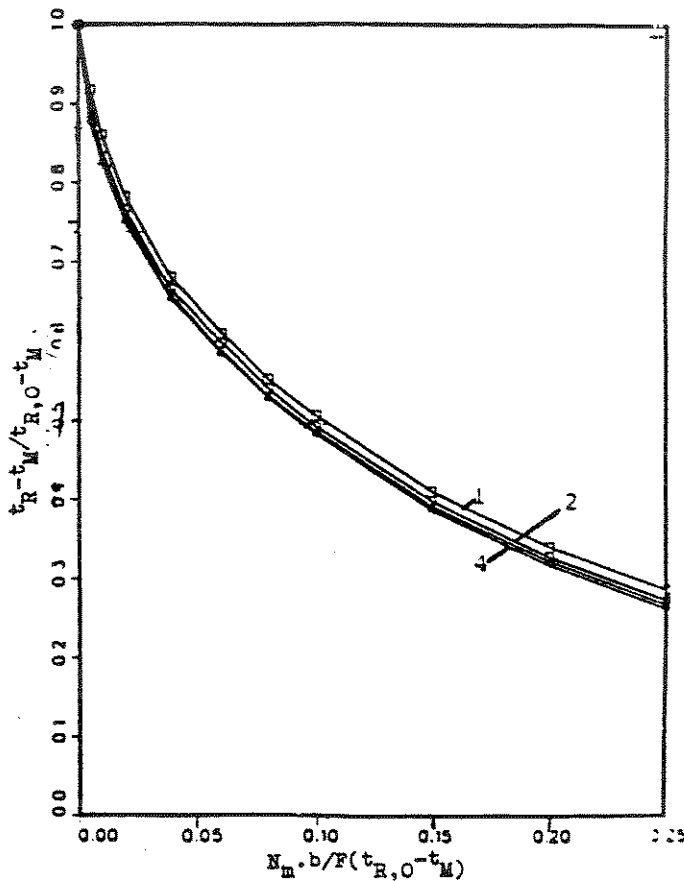


Figura II.17: Gráfico adimensional do tempo de retenção reduzido do máximo da banda, $(t_R - t_M)/(t_{R,O} - t_M)$, versus o fator de carregamento, L_f , para colunas com diferentes eficiências: (1) número de pratos teóricos $N = 1250$, (2) $N = 2500$, (3) $N = 5000$, (4) $N = 10000$.⁽⁴⁵⁾

Desta forma, no método do tempo de retenção, os parâmetros a e b da isoterma de Langmuir são obtidos através da medição dos tempos de retenção do soluto em uma injeção em escala analítica e em uma injeção em grande escala (com concentração conhecida). Conhecendo-se a eficiência da coluna, medida com relação ao composto analisado, e o tempo de retenção da fase móvel.

A maior desvantagem do método do tempo de retenção é que ele assume que a isoterma de adsorção no equilíbrio seja do tipo langmuiriana. Caso esta hipótese não seja válida, o valor obtido para b irá depender do tamanho da amostra utilizada. Deste modo, é necessário a repetição do procedimento para a medição do parâmetro b com pelo menos duas amostras diferindo em tamanho por cerca de uma ordem de magnitude. Uma outra desvantagem deste método é a sua aplicação restrita a sistemas onde a fase móvel é um solvente puro ou contém outros solventes ou aditivos que não competem com o soluto para adsorção nos sítios ativos do adsorvente. Porém, a grande simplicidade experimental do método, aliada aos resultados positivos obtidos em experimentos onde este foi comparado aos métodos de análise frontal, análise frontal por ponto característico e eluição por ponto característico⁽⁴⁵⁾ apontam para o fato de esta ser uma técnica promissora.

II.3.4 Métodos de Medição de Isotermas Competitivas^(56,57,59,68)

As purificações e separações por cromatografia líquida normalmente envolvem misturas com altas concentrações de solutos. Nestas condições, a interferência mútua entre os diversos solutos pode resultar em alterações significativas na isoterma com relação à obtida para o composto isoladamente. Como consequência, algumas vezes, pode-se fazer necessária a medição de isotermas competitivas. No entanto, a medição das isotermas individuais é bem mais simples, e não requer a complexa instrumentação contendo amostrador e analisador em linha, nem o rigoroso tratamento matemático envolvido nas técnicas de medição de isotermas competitivas.⁽⁵⁷⁾

Existem diversas técnicas para a medição de isotermas competitivas, mas os métodos que vêm classicamente sendo empregados no caso de cromatografia líquida são o método do balanço de massa e o método das velocidades compostas.

O método do balanço de massa (MMB), usado para medir a concentração do soluto na superfície do adsorvente, é uma extensão do método de análise frontal para a determinação de isotermas competitivas. A figura II.18 traz uma representação esquemática da curva obtida no caso de uma mistura contendo dois componentes. Quando as concentrações dos solutos são elevadas de C_{1a} e C_{2a} para C_{1b} e C_{2b} , desenvolvem-se duas frentes bem nítidas, conforme mostrado na figura II.18.

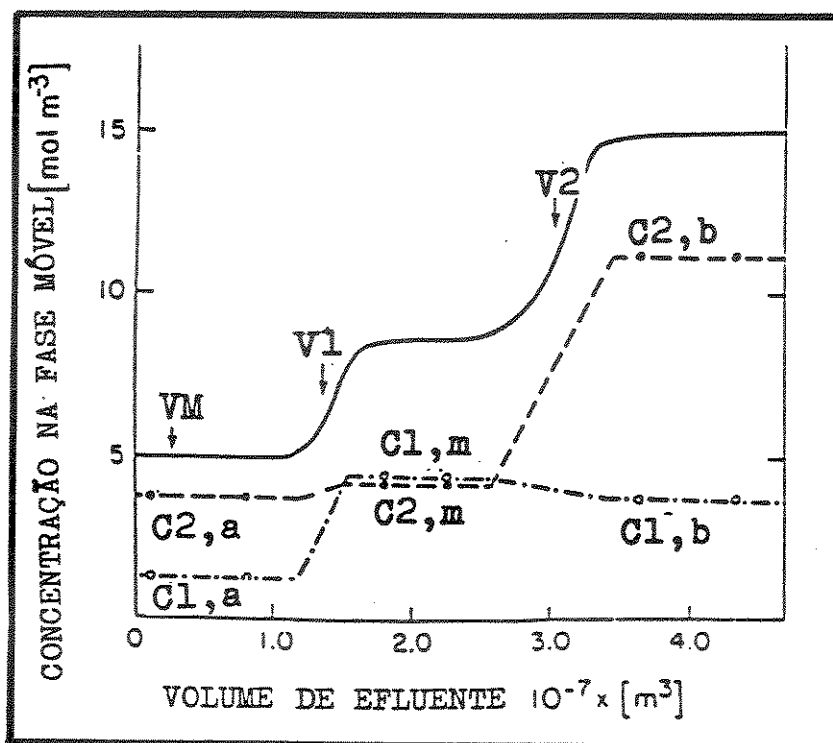


Figura II. 18: Representação esquemática de um experimento de análise frontal no qual a composição da fase móvel bombeada para a coluna é elevada de C_{1a} , C_{2a} para C_{1b} , C_{2b} . A composição da zona de mezanino no efluente da coluna é C_{1m} , C_{2m} . V_1 e V_2 são os volumes do efluente das fronteiras da zona de mezanino e V_M é o volume da fase móvel no sistema.⁽⁵⁷⁾

O aumento da quantidade do componente i ligado à superfície é dado pela seguinte equação:

$$\Delta q_i = q_{ib} - q_{ia} = [(V_2 - V_M)(C_{ib} - C_{ia}) - (V_2 - V_1)(C_{im} - C_{ia})] / V_{sp} \quad (II.22)$$

onde V_M é o volume da fase móvel no sistema, V_1 e V_2 são os volumes de efluente das frentes e V_{sp} é o volume de fase estacionária na coluna. Portanto, a isoterma de adsorção completa, na faixa de concentração de interesse, pode ser obtida através de diversos experimentos de análise frontal com diferentes combinações de concentrações inicial e final. Jacobson et al.⁽⁶⁵⁾ utilizaram este método em uma coluna microbore e descreveram o uso de um analisador em linha para a determinação das concentrações do mezanino, C_{1m} e C_{2m} , que devem ser obtidas juntamente com os volumes de efluente, V_1 e V_2 . Uma das vantagens do método do balanço de massa para a obtenção de isotermas é que o mesmo não é restrito aos compostos que exibem comportamento langmuiriano de adsorção, mas pode, em princípio, ser aplicado para qualquer sistema para o qual dados de análise frontal possam ser obtidos.

O método das velocidades compostas é uma técnica alternativa para a obtenção de isotermas de adsorção competitivas de substâncias cujo comportamento aproxima-se do descrito pelo modelo de Langmuir. Este método, baseado na teoria de cromatografia, requer apenas a medição dos volumes do efluente, V_1 e V_2 (figura II.18), no cromatograma de análise frontal. A regressão dos valores de V_i , determinados experimentalmente para diferentes combinações de concentrações, fornece os parâmetros de Langmuir, a_i e b_i , para cada um dos componentes da mistura.

Um outro método para a determinação de isotermas competitivas, denominado método da concentração do mezanino, emprega a medição da concentração do mezanino. Esta concentração é expressa, através de correlação, em termos dos parâmetros de Langmuir, a_i e b_i , e das concentrações inicial e final no início da coluna. Conseqüentemente, esta técnica fornece um conjunto alternativo de equações através das quais os valores medidos de C_{im} podem sofrer regressão para obtenção dos parâmetros a_i e b_i .

O método híbrido do balanço de massa é uma modificação do método do balanço de massa para obtenção de isotermas competitivas, no qual os valores de C_{im} da equação II.22 não são medidos, mas estimados usando os parâmetros de Langmuir obtidos pela regressão do método das velocidades compostas. Deste modo, a técnica necessita apenas da determinação experimental do volume do efluente, V_i , evitando o uso de um analisador em linha, como o empregado no método mais rigoroso do balanço de massa. Apesar desta técnica empregar valores da concentração na fase móvel estimados pelo método das velocidades compostas, ela fornece pontos discreto da isoterma de adsorção, como o método do balanço de massa, e a aplicação restrita a isotermas langmuirianas não é tão rígida como nos outros dois modelos.

Mais recentemente, um novo método, denominado método da raiz H_i , foi proposto para a determinação de isotermas competitivas para aplicação em cromatografia por deslocamento. Esta técnica emprega uma combinação de análise frontal e cromatografia por eluição e é restrita a sistemas langmuirianos. O método é baseado na velocidade de propagação das frentes e na composição dos mezaninos, mas não requer a estimativa de parâmetros e possui a vantagem adicional da possibilidade de emprego das soluções de processo, sem a necessidade de purificação.

A grande vantagem dos métodos do balanço de massa, da concentração do mezanino e da raiz H_i é o fornecimento de pontos discretos da isoterma. No entanto, os métodos do balanço de massa e da concentração do mezanino envolvem a medição da concentração do soluto na região de mezanino, o que resulta em maior complexidade experimental que os demais métodos, uma vez que necessita-se de um analisador em linha.

Em um experimento comparativo das técnicas de medição de isotermas individuais e competitivas, Hórvath et al.⁽⁵⁷⁾ mostraram que, no caso da mistura p-cresol/fenol, usando o método de análise frontal e o do balanço de massa, as isotermas individuais e

competitivas apresentam as mesmas formas (côncavas) e curvaturas iniciais similares. No entanto, as isotermas individuais de cada componente estão acima das respectivas isotermas competitivas, conforme é mostrado na figura II.19.

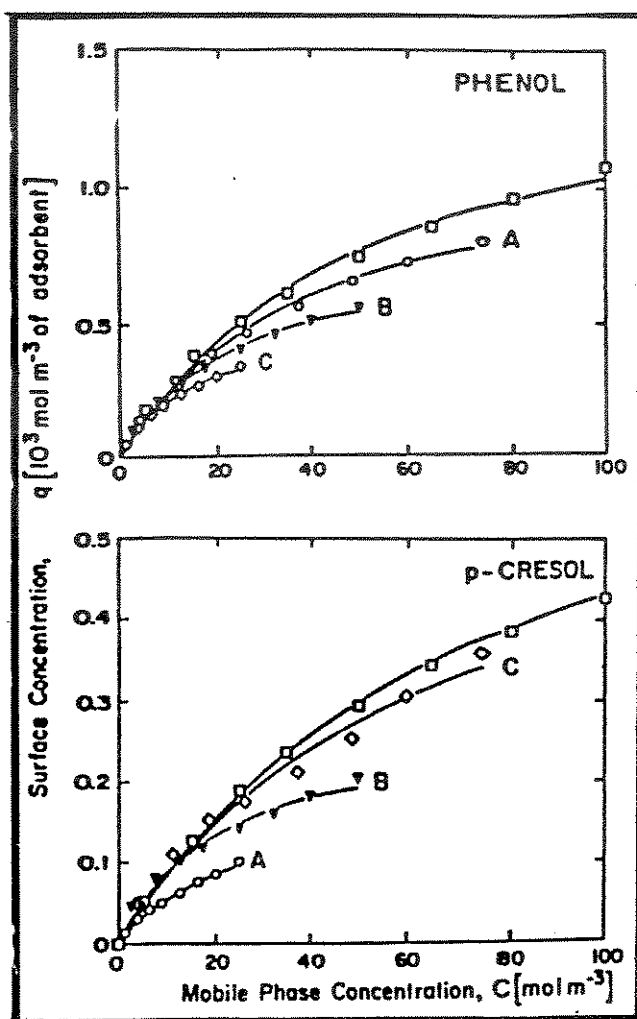


Figura II.19: Isotermas competitivas (A, B, C) e individuais de p-cresol e fenol. (A) p-cresol/fenol 1:3, (B) p-cresol/fenol 1:1, (C) p-cresol/fenol 3:1 (razão molar).⁽⁵⁷⁾

II.4 Considerações sobre os Compostos Digitálicos

II.4.1 Características Gerais

As plantas digitálicas, especialmente a *Digitalis purpurea*, eram utilizadas na preparação de venenos na idade média. Remédios feitos a partir das folhas secas da planta foram empregados desde cedo na medicina terapêutica, principalmente nas aplicações tópicas que promoviam a cicatrização de ferimentos. O uso de *Digitalis* na terapêutica cardíaca foi introduzido, em 1785, pelo médico escocês William Withering e teve bastante êxito.⁽⁶⁹⁾

Uma vez que a *Digitalis purpurea* contém uma mistura de diversos glicosídeos cardiotônicos e também algumas saponinas em quantidades e proporções que variam com sua localização e estação, as preparações digitálicas variam, consideravelmente, em potência e qualidade. Além disso, a dose terapêutica é tão baixa e próxima à dose tóxica que deve-se tomar bastante cuidado para não ultrapassar a dosagem segura.⁽⁶⁹⁾ Como consequência, mais recentemente, passou-se a empregar a digitoxina isolada da *Digitalis purpurea* e a digoxina isolada a partir da *Digitalis lanata* como cardiotônicos.

A *Digitalis purpurea* é uma planta nativa das ilhas britânicas e das áreas temperadas do oeste europeu e Marrocos. As folhas de plantas selvagens e de linhagens selecionadas para uso farmacêutico normalmente contêm, pelo menos, trinta glicosídeos (em quantidade total de 0,10 a 0,63%). Dentre os principais glicosídeos desta espécie estão o glicosídeo purpúrea A (que produz a digitoxina por perda de uma molécula de açúcar durante a extração) e o glicosídeo purpúrea B, precursor da gitoxina e da glucogitaloxina. A digitoxina é mil vezes mais ativa que as folhas pulverizadas, sendo rápida e completamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, causando pouca ou nenhuma irritação gástrica.⁽⁷¹⁾

A *Digitalis lanata* é nativa do sul e área central da Europa, principalmente ao longo do Rio Danúbio. Os principais glicosídeos desta espécie são os tetraglicosídeos: lanatosídeo A, lanatosídeo B, lanatosídeo C (maior proporção), lanatosídeo D e lanatosídeo E, dos quais são derivados, por perda de um grupo acetil, os glicosídeos purpúrea A e B, desacetil-lanatosídeos C e D e glucogitaloxina, respectivamente. A remoção de um grupo acetil e de uma molécula de glicose destes lanatosídeos origina, respectivamente, digitoxina, gitoxina, digoxina, diginatina e gitaloxina.⁽⁷³⁾

Nos Estados Unidos, a *D. lanata* não é utilizada na forma pulverizada, mas apenas como uma fonte de lanatosídeo C e digoxina. A digoxina foi adotada pela farmacopéia britânica em 1948 e é trezentas vezes mais forte que a *Digitalis* pulverizada preparada a partir de *D. purpurea*, além de ser mais estável e possuir ação e eliminação mais rápidas.⁽⁷¹⁾

A digitoxina, gitoxina, digoxina, diginatina e gitaloxina são glicosídeos que apresentam fórmulas estruturais bastante semelhantes, diferindo basicamente no número e posição de substituição de radicais hidroxila na porção aglicônica da molécula, com exceção da gitaloxina onde tem-se um radical -OCHO adicional localizado na porção aglicônica da estrutura.

A figura II.20 mostra as fórmulas estruturais dos três compostos digitálicos (lanatosídeo C, digoxina e digitoxina) utilizados nos ensaios de cromatografia por deslocamento.

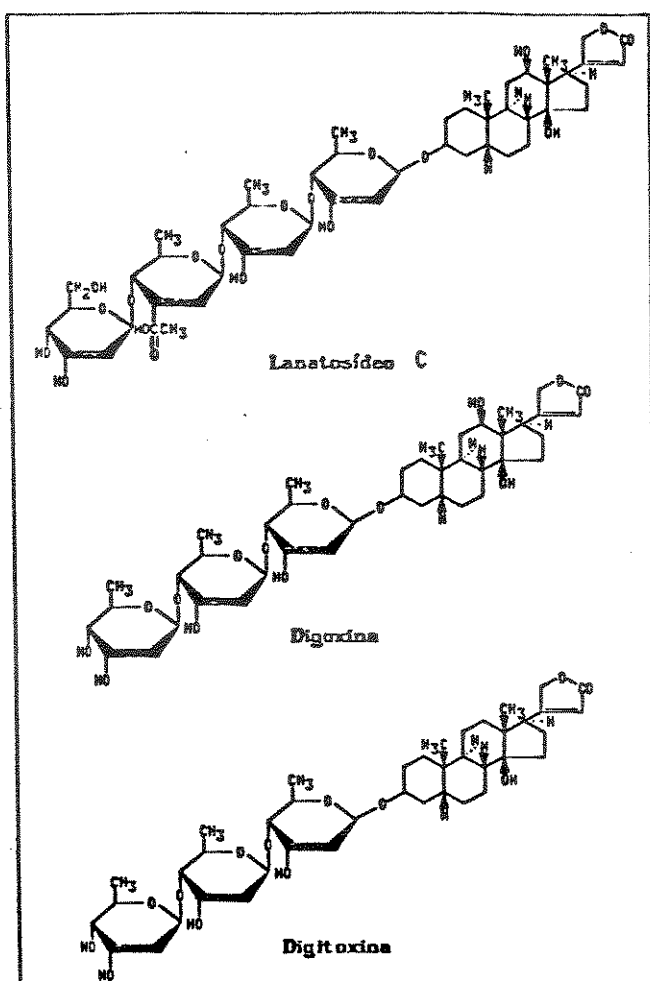


Figura II.20: Fórmula estrutural do lanatosídeo C, da digoxina e da digitoxina⁽⁷¹⁾

Conforme citado anteriormente, o lanatosídeo C é o precursor natural da digoxina na *Digitalis lanata*. A hidrólise deste à digoxina ocorre em dois estágios (Figura II.21) e envolve a enzima digilanidase, que é um constituinte natural da folha.⁽⁷²⁾

Durante a secagem das folhas de *D. lanata*, ocorre a hidrólise parcial do lanatosídeo C à digoxina. No entanto, para que haja a conversão total de lanatosídeo C à digoxina, é necessário que se utilize condições apropriadas durante o processo de extração.⁽⁷²⁾

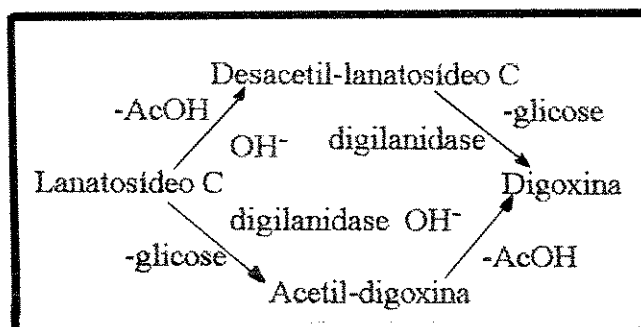


Figura II.21: Hidrólise de lanatosídeo C à digoxina⁽⁷²⁾

O lanatosídeo C apresenta-se na forma de cristais prismáticos e quando cristalizado de álcool e seco em alto vácuo a 150°C, apresenta ponto de fusão com decomposição a 248-250°C. É solúvel em piridina, dioxano, clorofórmio e éter de petróleo.⁽⁷¹⁾

A digoxina apresenta-se na forma de um pó cristalino branco e sem odor, bastante solúvel em piridina, parcialmente solúvel em clorofórmio e etanol/água (1:1) e, praticamente, insolúvel em água e em éter. A estabilidade da digoxina é bastante alta quando o composto é mantido em frasco fechado e ao abrigo de luz. As soluções de digoxina hidrolizam-se na presença de ácido, formando digitoxigenina bis-digitoxosídeo, digitoxigenina mono-digitoxosídeo e digitoxigenina. As soluções neutras de digoxina em etanol e propilenoglicol são estáveis por mais de cinco anos.⁽⁹⁾

Segundo Foss e Benezra⁽⁹⁾, nenhuma rota de síntese para a digoxina foi descrita em literatura, sendo o composto obtido comercialmente a partir da extração etanólica de folhas de *D. lanata*, seguida de purificação cromatográfica.

A digitoxina apresenta-se na forma de pequenos cristais retangulares alongados, a partir de etanol diluído, ou de um pó microcristalino branco ou levemente amarelado e sem odor. O máximo de absorção no ultravioleta de uma solução em metanol ocorre a 218 nm (ϵ 17,4 x 10³). A digitoxina é solúvel em éter, éter de petróleo, benzeno e óleo vegetal e praticamente insolúvel em água. Um grama do composto dissolve-se em cerca de 40 ml de clorofórmio, 60 ml de etanol e 400 ml de acetato de etila.⁽⁷³⁾

A análise de extratos líquidos de *D. purpurea* contendo digitoxina e gitoxina mostrou que a atividade das drogas diminuiu em mais de 10% do valor inicial após menos de três meses a 20°C. A velocidade de decomposição da gitoxina foi maior que a da digitoxina.⁽⁷³⁾

A digitoxigenina, um membro da família da digitoxina, sem as 3 moléculas de digitoxose, foi sintetizada utilizando-se metil-3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-5 β -etinato como matéria-prima em uma sequência de sete etapas.⁽⁷⁴⁾

II.4.2 Sistemas Cromatográficos Empregados para Separação de Compostos Digitálicos em Escala Analítica

Há muito tempo a cromatografia vem sendo reconhecida como uma técnica de grande valor na resolução e análise quantitativa de misturas de glicosídeos com atividade cardiotônica. O método de Zaffaroni e colaboradores⁽⁷⁵⁾ para a separação de misturas de esteróides em papel de filtro impregnado com formamida ou etilenoglicol foi utilizado por Reichstein e Schindler⁽⁷⁶⁾ para cromatografia de glicosídeos digitálicos. Posteriormente, alguns autores^(77 a 80) utilizaram cromatografia em papel para determinação quantitativa de glicosídeos digitálicos por eluição dos compostos seguida de diferentes ensaios

colorimétricos. A cromatografia em camada delgada sobre sílica gel foi usada por Stahl e Kaltenbach⁽⁸¹⁾ para a separação de pequenas quantidades de misturas de glicosídeos. Esta técnica também foi empregada para análise quantitativa por remoção das bandas resolvidas por eluição para a determinação colorimétrica.^(82 a 84) A densitometria direta dos cromatogramas em camada delgada é possível, mas, em geral, a complexidade dos extratos digitálicos faz com que a dosagem dos compostos individuais seja difícil e imprecisa. Evans e colaboradores⁽⁸⁵⁾ simplificaram a mistura presente nos extratos de *Digitalis purpurea* por hidrólise dos glicosídeos aos derivados aglicônicos, que foram dosados por densitometria dos cromatogramas em camada delgada. A precisão do método foi ampliada por adição de um padrão interno. No entanto, a desvantagem de métodos que empregam a hidrólise de glicosídeos é a possibilidade de formação de subprodutos.⁽⁷²⁾

Stoll e colaboradores⁽⁸⁶⁾ utilizaram as diferenças de polaridades dos compostos digitálicos para separá-los em colunas de sílica gel. As colunas cromatográficas também foram usadas para o enriquecimento de extratos digitálicos antes de suas análises por cromatografia em papel⁽⁸⁷⁾ ou em camada delgada.⁽⁸⁸⁾

A cromatografia gasosa também foi empregada da separação de glicosídeos cardiotônicos^(89,90), mas esta técnica envolve preparação prévia de derivados trimetilsilanos, tendo a desvantagem adicional de que a elevadas temperaturas pode haver decomposição dos compostos. Desta forma, a técnica de cromatografia gasosa é pouco aplicada na separação de tais misturas.

O advento da cromatografia líquida de alta eficiência introduziu uma técnica importante para a resolução de misturas complexas de compostos polares.⁽⁷²⁾ Evans⁽⁹¹⁾ discutiu algumas das dificuldades envolvidas na separação de compostos digitálicos por cromatografia de troca iônica, incluindo a ampla gama de polaridades dos glicosídeos e subprodutos, além do cromóforo relativamente fraco localizado na porção esteroidal da molécula, com absorção máxima a 220 nm. Lindner e Frei⁽⁹²⁾ propuseram colunas de sílica gel com uso de solventes com baixa absorção a 220 nm. Uma modificação simultânea da técnica de detecção e das propriedades cromatográficas foi obtida através do uso de reações de benzoilação nos grupos hidroxila não-aromáticos de esteróides e glicosídeos.⁽⁹³⁾ Lötscher e colaboradores⁽⁹⁴⁾ descreveram o uso de fases polares quimicamente ligadas e fases reversas não-polares para a separação de certos glicosídeos cardiotônicos e aglicones. A utilidade da adaptação de sistemas de fase reversa para a determinação quantitativa de baixos níveis de digoxina, digitoxina e seus metabólitos foi relatada por Castle.⁽⁹⁵⁾

Tratar-se-á aqui, detalhadamente, apenas dos sistemas de cromatografia líquida utilizados para a separação de glicosídeos digitálicos em escala analítica, sem a preocupação de descrição dos sistemas de cromatografia em papel, camada delgada ou gasosa. Deve-se, ainda, ressaltar que esta não é uma revisão exaustiva da literatura, mas apenas um levantamento visando detectar as fases mais empregadas na separação dos compostos em questão.

A tabela II.1 mostra vários exemplos de sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência empregados na análise de misturas de compostos digitálicos. Alguns destes sistemas são descritos mais detalhadamente a seguir, com exemplos dos cromatogramas obtidos.

Tabela II.1: Sistemas cromatográficos para a separação analítica de compostos digitálicos.

Amostra	Fase Estacionária	Dimensão da Coluna (Comp. x diâmetro) em mm	Fase Móvel	Vazão (ml/min)	Deteção	Resultados	Referência
Digoxina	Lichrosorb SI60 5 µm	150 x 3	8% CH ₃ OH em CH ₂ Cl ₂ saturado com água	2,0	UV 230 nm	Análise Quantitativa	9
Digoxina	Nucleosil C18	300 x 3,5	37% CH ₃ CN/H ₂ O ou 40% da mistura 1:1 CH ₃ CN/diox. sobre água	1,4 1,3	UV 220 nm	Análise Quantitativa	9
Digoxina	Lichrosorb SI60	250 x 3	n-ButOH/CH ₃ CN/nhep/H ₂ O (230:100:700:10) ou t-ButOH/CH ₃ CN/nhep/H ₂ O (220:70:800:10) ou (204:93:712:10,4) ou n-PentOH/CH ₃ CN/isooct/H ₂ O (270:93:660:9,3) ou (230:100:700:10) ou (170:60:620:10) ou (175:60:620:6)	1,3 2,2 - 1,3 1,4 1,3 -	UV 225 nm	Análise Quantitativa	9 e 94
Componentes da <i>Digitalis lanata</i>	Sílica gel 10 µm	250 x 4	ciclo-hex/CH ₃ CH ₂ OH/ CH ₃ COOH (60:90:1)	2,0	UV 234 nm	Boa separação de 5 componentes da mistura a longo tempo de análise	72
Glicosídeos da série A (laur. A, digitoxina, etc.)	Trocador catiônico forte (SCX)	-	4% de álcool amílico em água	-	UV	Boa separação de 5 componentes da mistura	91
Glicosídeos digitálicos	Sílica porosa	-	CHCl ₃ /CH ₃ OH	-	UV 220 nm	Boa separação de 7 componentes da mistura	92
Digoxina, digitoxina e seus metabolitos	µBondapak C18	300 x 4	gradiente linear de 25 a 40% CH ₃ CN/H ₂ O	2,2	UV 220 nm	Boa separação de 9 componentes da mistura	95
Digoxina, gitoxigenina e digitoxina	Versapak C18 10 µm	250 x 4,6	CH ₃ CN/H ₂ O (37:63)	1,7	-	Análise Quantitativa	96

Amostra	Fase Estacionária	Dimensão da Coluna (Comp. x diâmetro) em mm	Fase Móvel	Vazão (ml/min)	Deteção	Resultados	Referência
Glicosídeos da série C (lant. C, digoxina, etc.)	Lichrosorb SI60 5 µm	150 x 3	8% CH ₃ OH em CH ₂ Cl saturado com água	2,0	UV 220 nm	Boa separação de 4 componentes da mistura	97
Glicosídeos digitálicos	Nucleosil C18 10 µm	300 x 3,5	37% CH ₃ CN/H ₂ O	1,4	UV 220 nm	Boa separação de 7 componentes da mistura	97
Glicosídeos série C (lant. C, digoxina, etc.)	Nucleosil C18 10 µm	300 x 3,5	40% (CH ₃ CN/diox. 1:1)/H ₂ O	1,3	UV 230 nm	Boa separação de 4 componentes da mistura	97
11 Glicosídeos digitálicos e seus derivatizados aglicônios com 4 NBCl	Merckosorb SI60 5 µm	150 x 3	hex/CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN (10:3:3)	1,5	UV 254 nm	Boa separação de 12 componentes da mistura	98
Digoxina, digitoxina, gitoxina e desacetillanatosídeos	MCH 10	-	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (1:2:1)	-	UV 220 nm	Separação e determinação de 6 componentes da mistura	99
Digoxina, digitoxina	1% de cianoetil-silicone (ANH) em Zipax	1000 x 2,1	CH ₃ OH/H ₂ O (2,5:97,5)	0,5	UV	Análise Quantitativa	100
Digoxina, digitoxina	Octadecil-silano quimicamente ligado à sílica porosa ou micro-partículas de cerâmica 5-10 µm	300 x 3,9	H ₂ O/CH ₃ CN (55:45 e 37:13)	1,0	UV 218 nm	Análise Quantitativa	101
Mistura de digoxina, digitoxina, entre outros glicosídeos	RP-C18	-	CH ₃ OH/H ₂ O ou CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ CN	-	UV 230 nm	Separação e determinação de 5 componentes	102
Lanatosídeos A, B, C e digitoxigenina	Zorbax C8 ou Zorbax C18	-	CH ₃ OH/H ₂ O (65:35)	-	UV 225 nm	Análise Quantitativa	103

onde: nButOH = n-butanol, nhep = n-heptano, t-ButOH = terc-butanol, nPentOH = n-pentanol, isooct = iso-octano, 4 NBCl = cloreto de 4-nitrobenzoila, hex = hexano, npropOH = n-propanol, diox = dioxano

A figura II.22 mostra o cromatograma da separação de glicosídeos secundários em fase reversa, empregando-se uma mistura de 37% de acetonitrila em água como fase

móvel. Observa-se uma boa separação entre os compostos da mistura, apesar do longo tempo de análise.

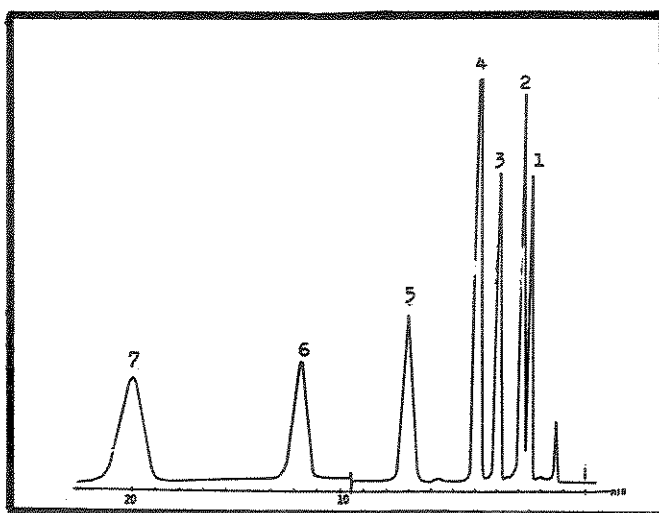


Figura II.22: Separação de glicosídeos secundários. Coluna: fase reversa C_{18} 10 μ m (300 x 3,5 mm), fase móvel: 37% CH_3CN/H_2O , 1,4 ml/min ($P = 100$ bar), injeção de 25 μ l de amostra e detecção UV 220 nm. Identidade dos picos: 1 = desacetil-lanatosídeo C, 2 = diginatina, 3 = digoxina, 4 = gitoxigenina, 5 = gitoxina, 6 = gitaloxina, 7 = digitoxina.⁽⁹⁷⁾

A separação de digoxina, digitoxina e seus metabolitos obtida por Castle⁽⁹⁵⁾ em fase reversa com gradiente linear de 25 a 40% de acetonitrila em água é ilustrada na figura II.23.

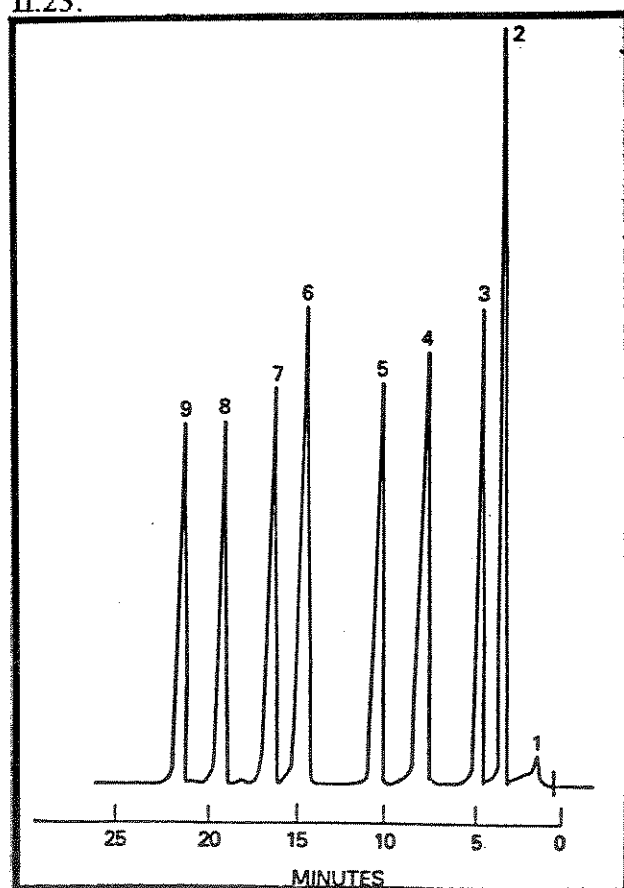


Figura II.23: Separação de digoxina, digitoxina e seus metabolitos por eluição em gradiente. Coluna μ Bondapak C_{18} , detecção: UV 220 nm, temperatura: 25°C, amostra: 10 nmoles de cada componente injetados em 75 μ l de etanol, fase móvel: gradiente linear de 25 a 40% de acetonitrila em água a 5%/min e 2,2 ml/min. Identidade dos picos: 1 = pico do solvente, 2 = digoxigenina, 3 = monodigitoxosídeo de digoxigenina, 4 = bisdigitoxosídeo de digoxigenina, 5 = digoxina, 6 = digitoxigenina, 7 = monodigitoxosídeo de digitoxigenina, 8 = bisdigitoxosídeo de digitoxigenina, 9 = digitoxina.⁽⁹⁵⁾

A separação de três derivados 4-nitrobenzóicos de cada uma das séries A, B, C, D e E de glicosídeos sobre sílica é ilustrada na figura II.24. A grande vantagem deste método é sua alta sensibilidade, obtendo-se limites de detecção são da ordem de 20 ng/ml.⁽⁹⁾

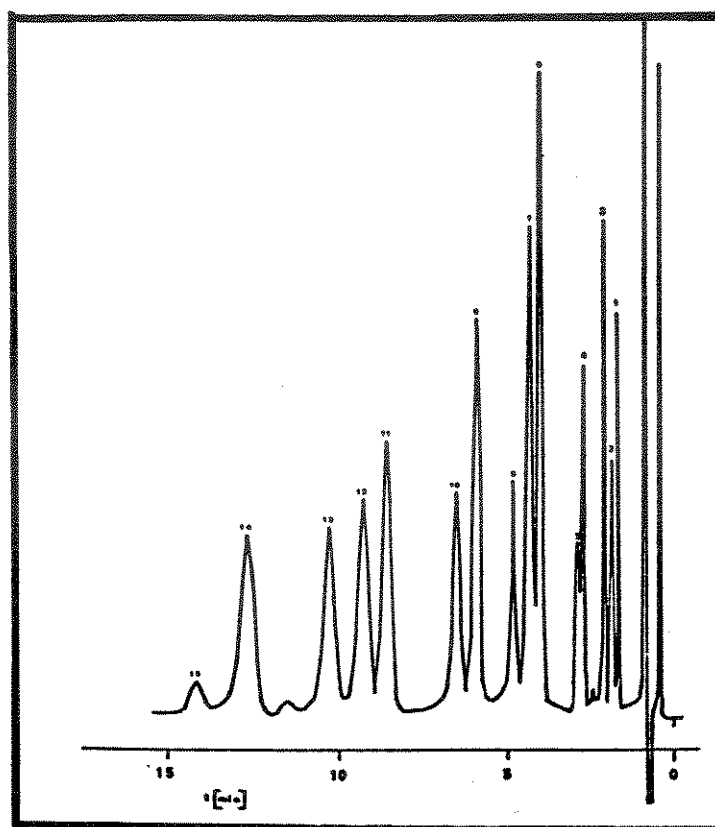


Figura II.24: Separação de três derivados 4-nitrobenzóicos de cada uma das séries A, B, C, D e E de glicosídeos digitálicos. Coluna: SI-60 5 μ m (150 x 3 mm), fase móvel: n-hexano-clorofórmio-acetonitrila (30:10:9), 1,5 ml/min, detecção: UV 254 nm, injeção de 20 μ l de amostra em clorofórmio. Identidade dos picos: 1 = gitoxigenina, 2 = digitoxigenina, 3 = diginatigenina, 4 = digoxigenina, 5 = gitaloxigenina, 6 = gitoxina, 7 = digitoxina, 8 = diginatina, 9 = digoxina, 10 = gitaloxina, 11 = lanatosídeo B, 12 = lanatosídeo A, 13 = lanatosídeo D, 14 = lanatosídeo C, 15 = lanatosídeo E⁽⁹⁾

As figuras II.25 e II.26 mostram a separação de glicosídeos secundários empregando-se colunas de sílica gel.

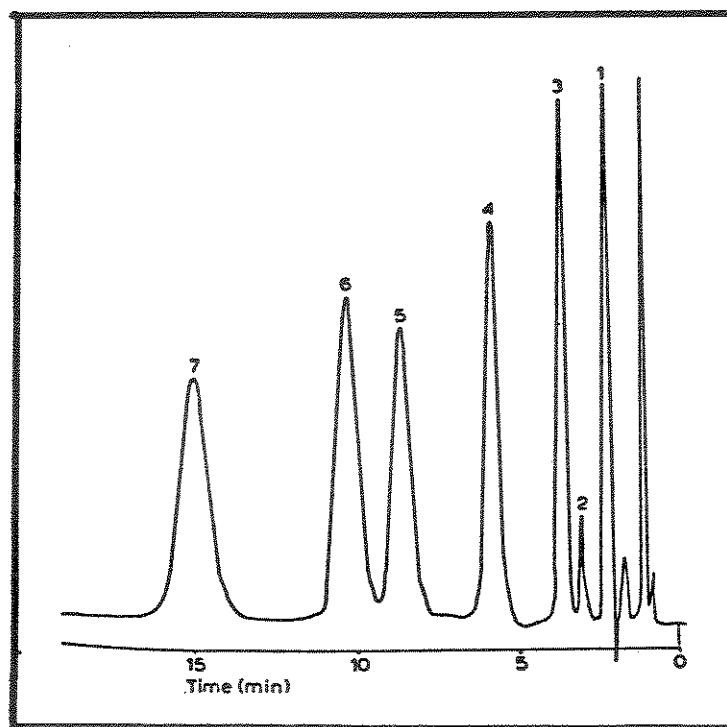


Figura II.25: Separação de glicosídeos secundários de *Digitalis*. Coluna: Lichrosorb SI-60 10 μ m (250 x 3 mm), fase móvel: n-pentanol/acetonitrila/isooctano/água (175:60:620:10) 1,3 ml/min, detecção: UV 220 nm, volume de amostra: 5 μ l. Identidade dos picos: 1 = digitoxigenina, 2 = gitoxigenina, 3 = digoxigenina, 4 = digitoxina, 5 = gitoxina, 6 = digoxina, 7 = diginatina.

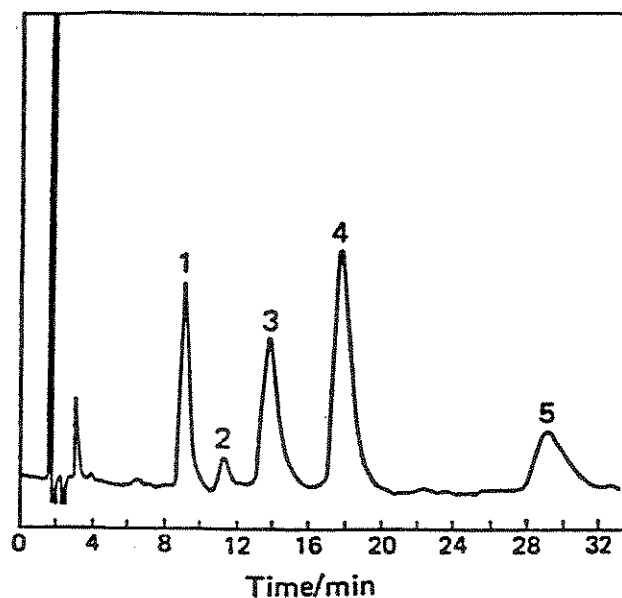


Figura II.26: Cromatograma de glicosídeos secundários de *D. lanata*. Coluna: sílica gel 10 μ m, fase móvel: ciclohexano/etanol absoluto/ácido acético glacial (60:90:1) 2,0 ml/min, detecção: UV 234 nm. Identidade dos picos: 1 = digitoxina, 2 = gitaloxina, 3 = gitoxina, 4 = digoxina, 5 = diginatina.

De acordo com o que foi exposto, pode-se observar que as fases estacionárias mais empregadas para a separação de glicosídeos digitálicos são sílica e octadecilsilano, sendo que no caso desta última, usa-se geralmente misturas acetonitrila/água como fase móvel. Em um estudo comparativo das separações destes compostos em fase normal e reversa, Erni e Frei⁽⁹⁷⁾ concluíram que cromatografia por adsorção e em fase reversa apresentam funções complementares devido ao amplo espectro de polaridade dos compostos envolvidos. Como a reversibilidade das ordens de separação é observada, pode-se, na maioria dos casos, escolher o modo mais adequado para a separação em questão, minimizando-se o tempo de separação e aumentando-se a resolução. Escolhendo-se o modo apropriado, as separações podem ser realizadas de maneira isocrática e à temperatura ambiente, com sistemas cromatográficos de fácil operação. Os sistemas em fase reversa parecem ser vantajosos com relação à preparação de amostras para dosagem de fármacos. A sensibilidade ligeiramente superior destes últimos sistemas pode ser importante quando da análise de subprodutos ou de fármacos com baixa dosagem.⁽⁹⁷⁾

II.4.3 Sistemas Utilizados para a Separação de Compostos Digitálicos em Escala Preparativa

Uma revisão bibliográfica completa dos métodos empregados na extração e purificação dos compostos digitálicos com aplicações farmacológicas seria difícil, pois os métodos variam bastante dependendo se deseja-se extrair apenas um composto puro, um composto enriquecido ou os vários compostos presentes em uma forma purificada. O escopo, portanto, é apenas ilustrar, através de exemplos, a complexidade e o alto custo envolvidos na extração e purificação destes compostos a partir de espécies de *Digitalis*, mostrando assim a importância do estudo de métodos alternativos.

A obtenção de compostos digitálicos a partir das diversas espécies de *Digitalis* (*lanata*, *purpurea*, etc.) é normalmente feita em duas etapas: extração e purificação, empregando-se as folhas secas da planta em questão. A extração é realizada utilizando-se solventes orgânicos, tais como metanol, acetato de etila, etanol, diclorometano ou misturas destes. Quando deseja-se a preparação de glicosídeos secundários (produtos de hidrólise de lanatosídeos, como por exemplo digoxina e digitoxina), as folhas secas são submetidas a auto-fermentação e/ou hidrólise alcalina em soluções aquosas, antes da extração. A purificação de um ou mais compostos presentes no extrato pode ser feita por extração líquido-líquido, seguida de cristalização, cromatografia líquida clássica ou cromatografia líquida a pressões moderadas.

A seguir, serão descritos sumariamente alguns processos para a obtenção de compostos digitálicos, utilizando-se *Digitalis lanata* e *Digitalis purpurea*. Outros processos encontram-se descritos na literatura.^(104 a 111)

No processo patenteado por Mohan Dhar e colaboradores em 1957⁽⁷⁾, as folhas de *D. lanata* são percoladas com etanol, o extrato etanólico é destilado a um volume reduzido e extraído com benzeno para a remoção de clorofila e compostos correlatos. Os

tanatos de glicosídeos podem então ser tratados com a enzima digilanidase numa mistura etanol/água (1:4) por 48 h a 37°C para a hidrólise de uma molécula de glicose. Posteriormente, a mistura é tratada com hidróxido de bário para que haja a hidrólise do grupo acetil e a precipitação de tanato de bário. O extrato em etanol aquoso é evaporado a secura e o resíduo, solubilizado em clorofórmio, é cromatografado em alumina, utilizando-se clorofórmio como solvente inicial, cuja polaridade é aumentada por adição de quantidades crescentes de etanol. A digitoxina é obtida nos eluatos de clorofórmio absoluto, a gitoxina em clorofórmio/etanol (90:10) e a digoxina em clorofórmio/etanol (85:15). Quantidades mínimas de lanatosídeos e derivados acetilados também são obtidas. Algumas modificações deste método são explicitadas⁽⁷⁾ para a obtenção de lanatosídeos ou derivados acetilados ao invés de digoxina, digitoxina e gitoxina.

Uma patente francesa de 1966⁽¹¹²⁾ descreve a obtenção de uma mistura enriquecida de lanatosídeo (cerca de 29% em lanatosídeos) por extração das folhas de *D. lanata* com etanol 70%, seguida de destilação parcial do etanol, extração da digoxina com clorofórmio, extração com acetato de etila após adição de sulfato de amônio, destilação do acetato, solubilização em metanol, filtração e, finalmente, destilação do metanol, deixando um resíduo seco contendo lanatosídeos hidrofílicos.

Makarevich e colaboradores⁽¹¹³⁾ descreveram um processo para obtenção de digitoxina a partir de *D. purpurea*. Inicialmente, as folhas são submetidas à auto-fermentação aquosa, seguida da extração da digitoxina em diclorometano/etanol 93:7. O extrato é lavado com uma mistura benzeno/dimetilformamida para remoção de clorofila e alcatrão, sendo a digitoxina extraída com benzeno/clorofórmio 3:2. O solvente é destilado e o resíduo, redissolvido em clorofórmio, é purificado em coluna de alumina. Após destilação do clorofórmio e cristalização do resíduo em benzeno, obtém-se a digitoxina.

Kühne e colaboradores⁽¹¹⁴⁾ patentearam um processo no qual as folhas fermentadas de *D. lanata* são extraídas com etanol, o solvente é destilado parcialmente, sendo o resíduo adsorvido sobre pó de poliacrilonitrila, que é seco posteriormente. O resíduo é extraído com metanol, o solvente é destilado e o resíduo é redissolvido em clorofórmio. O extrato clorofórmico é lavado com água, seco e destilado, sendo o novo resíduo recristalizado de uma mistura etanol/água. Obtém-se uma mistura contendo digoxina, digitoxina, gitoxina e diginatina. Uma modificação deste processo que emprega folhas não fermentadas leva à obtenção de uma mistura de lanatosídeos A, B, C, D e E.

No processo patenteado por Langlume, a digoxina é obtida pela extração metanólica de folhas de *D. lanata*, seguida de extração com clorofórmio, concentração do extrato e cromatografia sobre alumina, utilizando-se uma mistura clorofórmio/metanol 90:10 como eluente. O solvente do eluato é evaporado e o resíduo é tratado com acetato de etila a refluxo e, então, resfriado. Adiciona-se água e deixa-se em repouso por uma hora. Em seguida, é feita a adição de clorofórmio, a filtração e a destilação do solvente. O resíduo é novamente cromatografado sobre alumina, utilizando-se clorofórmio/metanol 95:5, seguido de clorofórmio/metanol 90:10 e clorofórmio/etanol 50:50 como eluentes. Os eluatos são concentrados, tratados novamente com acetato de etila sob refluxo, o

solvente é evaporado e o resíduo é tratado com clorofórmio sob refluxo. Após a adição de etanol têm-se a cristalização da digoxina que é, finalmente, filtrada.

Mais recentemente, Šledzinska⁽¹¹⁵⁾ propôs um processo de separação de lanatosídeos A, B e C por cromatografia líquida a pressões moderadas. As misturas de lanatosídeos foram obtidas por pré-concentração e purificação parcial de extratos metanólicos de *D. lanata*. A unidade cromatográfica preparativa era composta por uma coluna de 50 cm x 10 cm I.D. de aço inoxidável recheada com sílica gel Si 60 (E. Merck) dp = 40-63 μ m, duas bombas ($P_{máx} = 40$ atm), uma para bombeamento de fase móvel e outra para amostra, acopladas a um sistema automático de amostragem, um coletor de frações e um detector UV-visível. A fase móvel empregada foi uma mistura diclorometano/metanol/água e fez-se um estudo da importância da proporção de água na separação da mistura. Segundo a autora, as vantagens de tal sistema são: a possibilidade de separação de grande quantidade de material, 10^{-2} g/g de sílica, a facilidade de ajuste da força da fase móvel, a volatilidade, baixa viscosidade e seletividade da fase móvel, a fácil regeneração e longa vida da coluna e a economicidade do processo.

Concluindo-se, pode-se dizer que os métodos mais clássicos de obtenção de glicosídeos digitálicos consistem na extração alcoólica das folhas, seguida de purificações prévias por extrações líquido-líquido e separação por cromatografia líquida clássica, utilizando-se, em geral, alumina como fase estacionária. Os componentes obtidos nos eluatos são, então, cristalizados em solvente apropriado.

Cabe, ainda, mencionar que o alto custo associado à digoxina e à digitoxina no mercado internacional é, em grande parte, devido à proporção relativamente baixa em que estes aparecem na *D. lanata* e *D. purpurea*, respectivamente, e ao alto custo dos processos utilizados para extração e purificação destes compostos.

PARTE III: PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Materiais

III.1.1 Reagentes

Os compostos digitálicos: digoxina, digitoxina e lanatosídeo C foram fornecidos pela Sigma. Cicloexanol, hexanol e octanol foram obtidos da Aldrich. Metanol, etanol, 2-propanol, butanol, acetonitrila, acetato de etila, n-hexano e clorofórmio foram fornecidos pela Allied Fisher.

III.1.2 Colunas

- Testes de eluição (colunas comerciais):

	Fornecedor
Octilsilano - Ultrasphere TM Octyl 5 μ m (250 x 4,6 mm)	Beckman
Octadecilsilano - Zorbax ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm)	DuPont
Octadecilsilano - Nova Pack C18 4 μ m (300 x 3,9 mm)	Waters
Sílica - Resolv 5 μ m (150x3,9 mm)	Waters
Sílica ligada a grupo amino - Zorbax NH ₂ (100 x 3,9 mm)	DuPont
Sílica ligada a grupo fenil - μ Bondpak Phenyl (150 x 3,9 mm)	Waters
Sílica ligada a grupo ciano - Zorbax CN (250 x 4,6 mm)	DuPont

• Ensaios de deslocamento e medição de isotermas: a fase estacionária utilizada foi Zorbax ODS 5 μ m (DuPont). As colunas em aço inoxidável (250 x 4,6 mm) foram recheadas em laboratório, utilizando-se a técnica de suspensão (solvente de suspensão: 2-propanol, solvente de propulsão: 2-propanol, solvente de condicionamento: metanol/água 1:1) a uma pressão de 8500 psi.

• Análise: as colunas utilizadas para as análises quantitativas foram: Zorbax ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm; DuPont) e Novo Pack C18 4 μ m (300 x 3,9 mm; Waters).

III.2 Equipamentos

III.2.1 Cromatografia por eluição (teste de eluição e análise das frações)

O equipamento consistia de um reservatório de solvente ligado à bomba LKB modelo 2150, a qual se encontrava conectada a um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 20 μ l. O efluente da coluna foi monitorado por um detector ultravioleta/visível (ABI - Analytical Kratos Division, modelo 757) a 240 nm, o qual encontrava-se conectado a um integrador Shimadzu modelo C-R3A. Para a análise de

octanol, butanol, cicloexanol e hexanol, utilizou-se detector de índice de refração Knaver conectado a um registrador Inseis modelo L6512.

O equipamento utilizado nestes ensaios encontra-se esquematizado na figura III.1

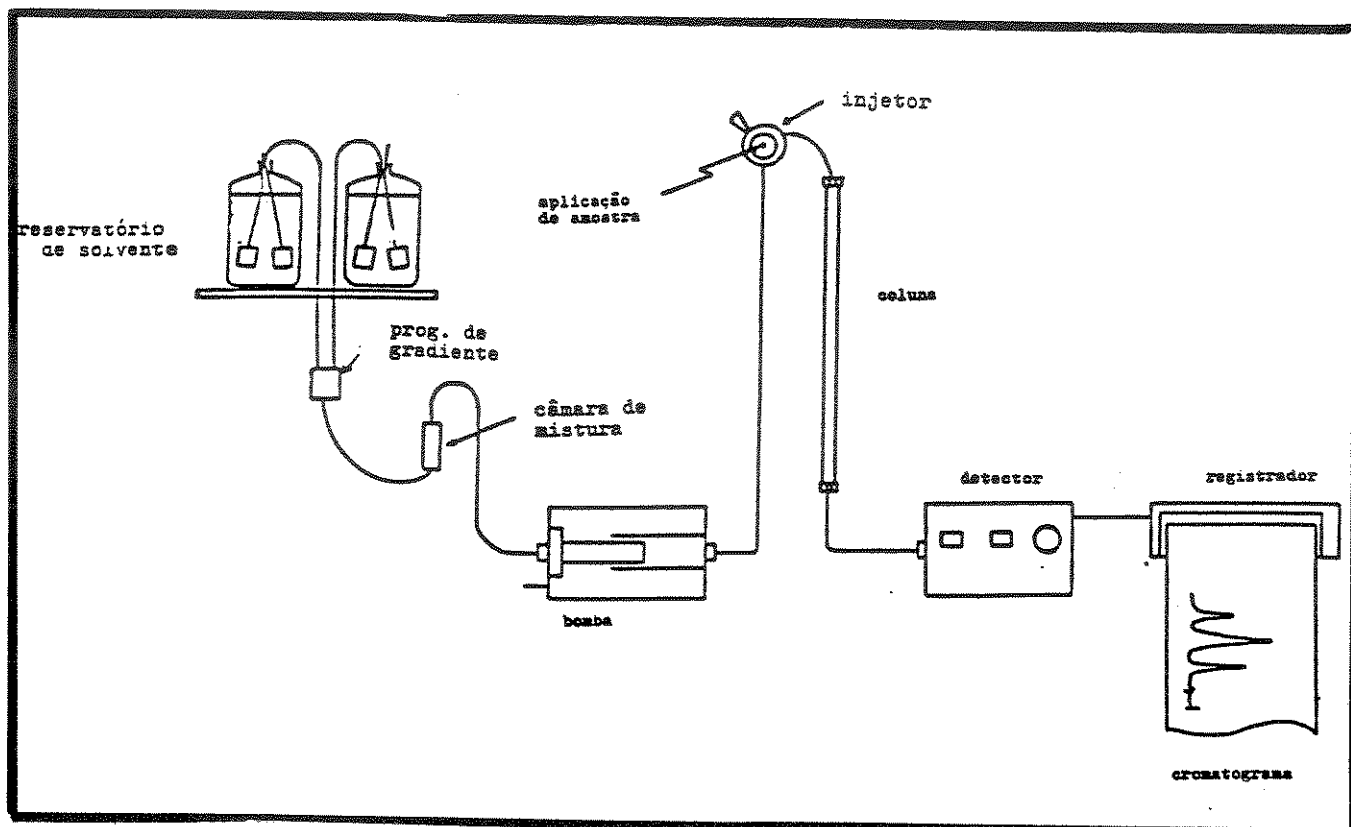


Figura III.1: Esquema da aparelhagem utilizada nos testes de cromatografia por eluição.⁽¹¹⁶⁾

III.2.2 Cromatografia por Deslocamento

O equipamento utilizado era basicamente o mesmo usado nos testes de eluição e análise, possuindo apenas algumas alterações, a saber: troca do injetor por um outro com amostrador de 2,0 ou 5,0 ml; utilização de 1 ou 2 colunas ligadas em série; uso de um banho de água recirculante para controle da temperatura das colunas, quando trabalhava-se a altas temperaturas, e utilização de um coletor de frações após o detector ultra-violeta/visível, o qual se encontrava conectado a um registrador Inseis modelo L6512.

Um esquema da aparelhagem utilizada encontra-se representado na figura III.2.

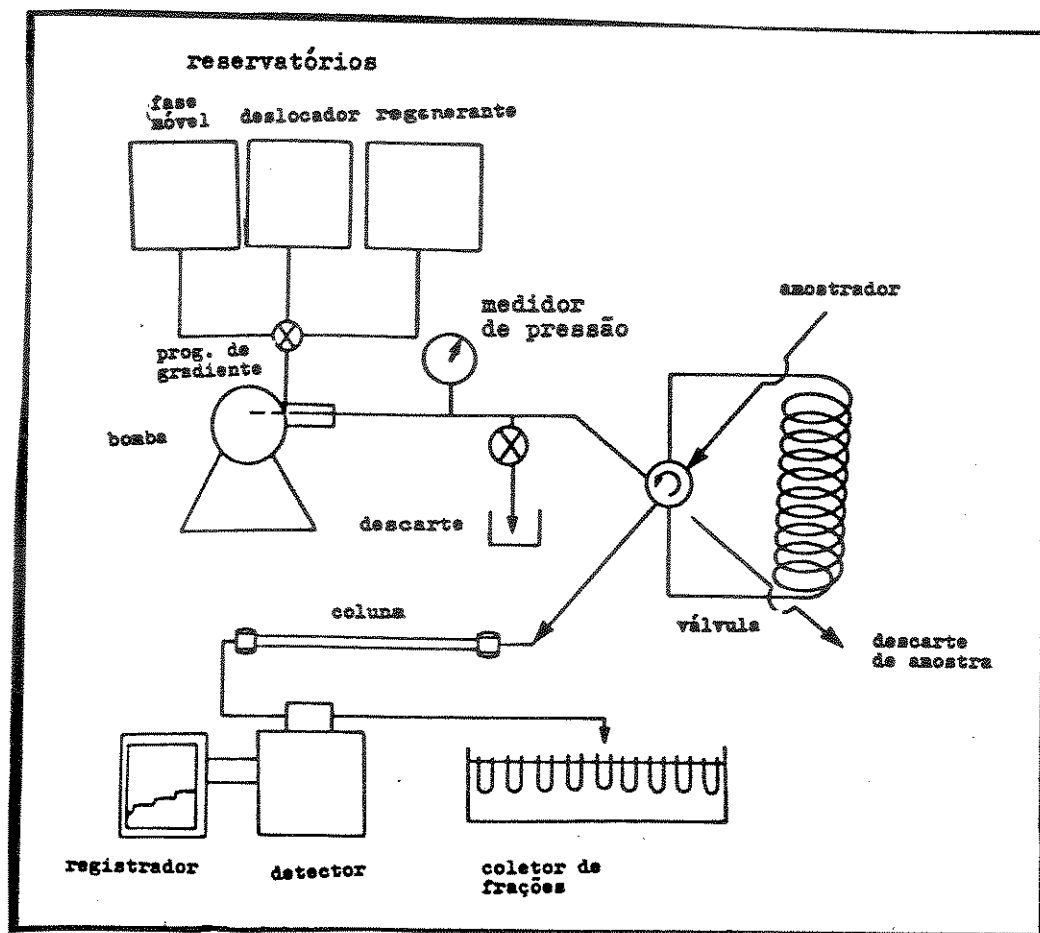


Figura III.2: Esquema da aparelhagem utilizada nos testes de cromatografia por deslocamento.⁽⁵¹⁾

III.2.3 Medição de Isotermas

- No método do tempo de retenção, o equipamento era exatamente o mesmo utilizado em cromatografia por eluição.
- No método de análise frontal as únicas modificações em relação ao equipamento usado em cromatografia por eluição foram a substituição do amostrador (5 a 20 ml), quando necessária, e o uso do registrador ao invés do integrador.

Na medição das isotermas por ambos os métodos a temperatura da coluna foi mantida a 25°C através do uso de um banho de água recirculante.

III.3 Procedimentos

III.3.1 Testes de Limite de Solubilidade

Pesou-se cerca de 0,0010 g ($\pm 0,00005$ g) do produto em balança analítica, utilizando-se tubos de centrifugação e adicionou-se o solvente em incrementos de 10 a 100 μ l através do uso de pipeta "Ependorf" de 100 μ l. Após cada adição de solvente, a mistura era homogeneizada por 10 minutos em agitador e o limite de solubilidade era obtido quando, através da observação a olho nú, não era mais detectada a presença de sólido. Nos testes a temperaturas elevadas o tubo era mantido em banho termostaticado por 10 minutos sob agitação manual, após a agitação padronizada em agitador.

III.3.2 Testes de Eluição

Utilizou-se soluções padrões de digoxina, digitoxina e lanatosídeo C com concentrações na faixa de 50 a 125 μ g/ml no eluente testado. Preparou-se também um mistura padrão contendo os 3 componentes na mesma faixa de concentração anterior. O tempo de retenção dos componentes no sistema testado era medido em duplicata, utilizando-se o detector UV/visível a 240 nm. Na maioria dos casos, a vazão da fase móvel usada foi de 1 ml/min. Para os testes de escolha do agente de deslocamento utilizou-se detector de índice de refração, sendo que a concentração do produto testado variou de acordo com sua solubilidade na fase móvel selecionada e com a sensibilidade do detector ao referido componente.

III.3.3 Medição de Isotermas

A medida das isotermas de adsorção dos componentes foi feita por dois métodos: o do tempo de retenção⁽⁶⁰⁾ e o de análise frontal.⁽⁵⁴⁾

No método do tempo de retenção (pg. 39), os parâmetros a e b da isoterma de Langmuir $C_s = [a C_M / (1 + b C_M)]$ foram obtidos através da medição dos tempos de retenção do composto em uma injeção em escala analítica e em uma injeção em grande escala (com concentração conhecida), da medida da eficiência da coluna com relação ao composto analisado e da medição do tempo de retenção da fase móvel.

A coluna usada foi Zorbax ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm) e a fase móvel foi uma mistura metanol/água (80:20 v/v) a uma vazão de 1,0 ml/min. Os compostos analisados e suas respectivas concentrações encontram-se na tabela III.1.

Tabela III.1: Concentrações utilizadas para a medição de isotermas pelo método do tempo de retenção

Composto	Concentrações
lanatosídeo C	39 µg/ml e 3,9 mg/ml
digoxina	39 µg/ml e 3,9 mg/ml
digitoxina	41 µg/ml e 4,1 mg/ml
octanol	3,3 e 500 mg/ml
butanol	10 e 500 mg/ml

Para a detecção de lanatosídeo C, digoxina e digitoxina, utilizou-se detector UV/visível a 240 nm, enquanto que para o octanol, butanol e a fase móvel, usou-se detector de índice de refração. O tempo de retenção de cada uma destas soluções foi analisado em duplicada ou triplicata.

Para a medição da eficiência da coluna em relação ao composto utilizado, usou-se a injeção em concentração mais baixa do referido composto e o procedimento descrito para a avaliação da eficiência da coluna após sua regeneração (item III.3.8).

No método de análise frontal, relaciona-se a velocidade de uma frente de concentração formada pelo aumento discreto de concentração do soluto ao valor da isoterma de adsorção desse, a concentrações elevadas. Desta forma, cada mudança discreta de concentração do soluto origina um ponto de sua isoterma

A coluna utilizada nestas medições foi Zorbax ODS 5 µm (250 x 4,6 mm) e a fase móvel foi uma mistura metanol/água na proporção 80:20 ou 65:35 (v/v).

Para a obtenção das isotermas pelo método de análise frontal foram feitas medidas de, pelo menos, quatro pontos cujas concentrações, no solvente usado como fase móvel, encontram-se na tabela III.2.

Tabela III.2: Concentrações utilizadas para a medição de isotermas pelo método de análise frontal

Composto	Fase Móvel	
	CH ₃ OH/H ₂ O (80:20) Concentrações (mg/ml)	CH ₃ OH/H ₂ O (65:35) Concentrações (mg/ml)
lanatosídeo C	0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0	0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 1,8
digoxina	0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0	0,5; 1,0; 1,5; 2,0
digitoxina	1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 6,5	0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5
octanol	3,5; 7,0; 14,7; 20,0; 25,0; 30,0	3,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0
butanol	-	3,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0
ciclohexanol	-	3,5; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0
hexanol	-	3,5; 10,0; 11,25; 20,0; 25,0; 30,0

Para a medição das isotermas de octanol, butanol, ciclohexanol e hexanol, após equilíbrio da coluna com a fase móvel, as soluções eram bombeadas diretamente para a coluna, a uma vazão de 0,35 ml/min até que se obtivesse uma linha de base estável. Neste ponto, interrompia-se o funcionamento da bomba, trocando-se o reservatório de solvente por um outro contendo o soluto com concentração mais elevada. Iniciava-se novamente o bombeamento da solução até que, após a obtenção do pulso de concentração, se tivesse uma nova linha de base estável. Este procedimento foi repetido até o bombeamento da solução de mais alta concentração. Após a medição da isoterma de cada composto, a coluna era regenerada com metanol e sua eficiência era checada antes da medição da isoterma seguinte. Com exceção da isoterma do octanol, que foi medida em duplicada com metanol 80% para checagem de reprodutibilidade do método, as demais isotermas foram medidas apenas uma vez.

Na medição das isotermas de lanatosídeo C, digoxina e digitoxina, ao invés de bombear-se a solução diretamente para a coluna, usou-se um amostrador de tamanho apropriado (5 a 20 ml) e quando necessário, desligava-se a bomba para recarga do amostrador. Nestas medidas, a vazão da fase móvel variou de 0,25 a 0,5 ml/min e a detecção foi feita utilizando-se detector ultravioleta a 265 nm, ao invés da detecção por índice de refração utilizada nas demais medições.

Durante as medidas das isotermas, toda vez que a bomba era desligada, o registrador era desligado simultaneamente para que se obtivesse uma medida do volume de retenção da frente mais exata possível.

III.3.4 Curvas de Calibração

Utilizou-se a coluna Zorbax ODS 5 μ m (250x4,6 mm) e uma mistura metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel para digoxina, digitoxina e octanol e a mistura metanol/água (65:35 v/v) para o lanatosídeo C e o hexanol. A fase móvel foi utilizada a uma vazão de 1,0 ml/min.

Para a digoxina, digitoxina e o lanatosídeo C, preparou-se uma solução padrão de 1,0 mg/ml, fazendo-se diluições a 400,0; 200,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 12,5 μ g/ml. A medida da área sob o pico destas soluções foi feita através da média de três injeções consecutivas com detecção por ultravioleta a 240 nm. As curvas de calibração do octanol e hexanol foram medidas utilizando-se soluções nas seguintes concentrações: 6,00; 3,00; 2,00; 1,00; 0,60 e 0,30 mg/ml para o octanol e 6,00; 4,00; 2,00; 1,00 e 0,50 mg/ml para o hexanol, as quais foram injetadas em triplicata e detectadas por detector de índice de refração.

A medida do limite de detecção, em cada caso, foi feita utilizando-se soluções cada vez mais diluídas até que se obtivesse uma área de cerca de duas vezes o valor do ruído de fundo.

III.3.5 Cromatografia por deslocamento

Estes experimentos foram realizados utilizando-se 1 ou 2 colunas de octadecilsilano (Zorbax ODS - 5 μ m - 250 x 4,6 mm) ligadas em série e misturas metanol/água nas proporções 80:20 ou 65:35 v/v como fase móvel, a uma vazão de 0,2 ml/min. A mistura digoxina/digitoxina/lanatosídeo C era preparada na fase móvel, numa faixa de concentração de 0,3 a 3,2 mg/ml, e filtrada antes de sua utilização. A solução do agente de deslocamento também foi preparada na fase móvel com concentrações variando entre 13,6 e 74,4 mg/ml. Inicialmente, a coluna era equilibrada com a fase móvel na temperatura do experimento. Atingido o equilíbrio, a vazão de fase móvel era interrompida e preenchia-se o volume de tubulação até a entrada do injetor com solução do agente de deslocamento. A mistura era então injetada, sendo simultaneamente iniciada a vazão de agente de deslocamento. A coleta de frações era feita em volumes maiores até que se observasse o início da coleta de frações dos componentes da mistura, indicada pelo aumento do sinal do detector ultravioleta a 255 nm, quando eram coletadas frações de 200 μ l. As frações e a mistura eram, posteriormente, analisadas quantitativamente por CLAE.

III.3.6 Análise das Frações

As colunas usadas para análise foram Zorbax ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm) ou Nova Pack C18 4 μ m (300 x 3,9 mm). Para a análise das frações contendo digoxina/lanatosídeo C e/ou hexanol usava-se como fase móvel a mistura metanol/água (65:35 v/v) e, para a análise das frações contendo digoxina/digitoxina e/ou octanol, utilizava-se metanol/água (80:20 v/v). O detector de ultravioleta a 240 nm usado para os compostos digitálicos era substituído pelo de índice de refração para análise de octanol e hexanol. As frações eram diluídas a 10, 50 ou 100 vezes, de acordo com suas concentrações, e injetadas contra padrões de concentração na faixa de 25 a 30 μ g/ml, que eram injetados em triplicata no decorrer da análise. A concentração dos componentes na mistura inicial também era analisada. A análise das frações contendo o deslocador eram feitas com diluição a 5 ou 10 vezes, ou ainda, sem diluição alguma, contra solução padrão de octanol ou hexanol em concentração próxima à das amostras diluídas.

III.3.7 Regeneração da Coluna

A coluna utilizada no experimento de deslocamento ou medição de isoterma era regenerada com metanol a uma vazão de 1,0 ml/min por 1 a 2 horas. Após regeneração, sua eficiência era verificada.

III.3.8 Avaliação da Eficiência da Coluna

A eficiência da coluna foi avaliada através da medida de pratos teóricos feita com solução padrão de digitoxina 400 μ g/ml injetada em triplicata, nas mesmas condições de

análise deste componente. O cálculo do número de pratos teóricos era feita através da equação III.1.

$$n = 5,545 (t_R/wh)^2 \quad e \quad wh = 0,9394 A/ht \quad (III.1)$$

onde:

n = número de pratos teóricos em uma coluna de 25 cm

t_R = tempo de retenção da digitoxina

wh = largura do pico a meia altura

A = área do pico

ht = altura do pico

Para fins comparativos, a eficiência inicial das colunas Zorbax ODS e Nova Pack C18 também foi medida usando-se digitoxina 35 µg/ml.

PARTE IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Seleção do Sistema Cromatográfico

IV.1.1 Testes de Limite de Solubilidade

Como a técnica de cromatografia por deslocamento envolve a utilização de condições onde a coluna encontra-se sobrecarregada, na seleção do sistema cromatográfico empregado é de suma importância que se considere a solubilidade dos compostos na fase móvel, além dos critérios usuais de seletividade e eficiência. Desta forma, foram realizados ensaios que objetivavam detectar os melhores solventes para os compostos digitálicos selecionados.

Uma vez que estes testes não foram realizados em duplicata, e a observação da solubilização a olho nu é muitas vezes dúbia, os resultados obtidos não são rigorosamente exatos. No entanto, como o escopo destes testes era apenas a comparação da solubilidade nos diversos solventes empregados para as separações analíticas destes compostos, os dados obtidos são suficientes.

Os resultados dos testes de limite de solubilidade nos diversos solventes empregados encontram-se relacionados na tabela IV.1. Conforme pode ser observado, a maioria dos ensaios só foi feita para a digitoxina devido à disponibilidade de pouca quantidade de digoxina e lanatosídeo C.

Tabela IV.1: Limite de solubilidade

Solvente	Limite de solubilidade		
	Digoxina	Digitoxina	Lanatosídeo C
CH ₃ OH/H ₂ O (80:20 v/v)	4,0 mg/ml	7,0 mg/ml	6,0 mg/ml
CH ₃ OH/H ₂ O (72:28)	-	2,8 mg/ml	-
CH ₃ OH/H ₂ O (65:35) {	25°C	2,4 mg/ml	-
		-	-
CH ₃ OH/H ₂ O (65:35) {	45°C	2,8 mg/ml	2,0 mg/ml
		-	-
CH ₃ OH/H ₂ O (55:45)	-	1,0 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ OH	-	17,0 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O (80:20 v/v)	-	14,0 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O (70:30)	-	12,0 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O (60:40)	-	5,0 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O (50:50)	-	3,5 mg/ml	-
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	-	2,5 mg/ml	-
CH ₃ CN	-	menos de 1,0 mg/ml	-
acetato de etila/n-hexano (50:50)	-	menos de 1,0 mg/ml	-
CH ₂ Cl ₂	-	7,0 mg/ml	-

Os resultados obtidos demonstram que o etanol e o metanol são os melhores solventes para digitoxina e que a mistura de água nestes solventes reduz a solubilidade do composto.

IV.1.2 Testes de Eluição

A revisão bibliográfica dos sistemas cromatográficos empregados para a separação de compostos digitálicos em escala analítica evidenciou que existem dois tipos de sistemas normalmente empregados: o em fase normal, que envolve o uso de colunas de sílica porosa com fases móveis que empregam misturas de álcoois e solventes clorados, e o em fase reversa que utiliza colunas de octadecilsilano com fases móveis constituídas de misturas álcool/água ou acetonitrila/água.

Com base nestes dados e nos resultados dos ensaios de limite de solubilidade, deu-se início aos testes de eluição cujos resultados são apresentados na tabela IV.2.

Tabela IV.2: Testes de eluição

Coluna(1)	Fase Móvel (v/v)	Vazão (ml/min)	Detector(2) Comprimento de onda (nm)	Tempo de Retenção (min)				Fator de Separação $\alpha = t_{R2} / t_{R1}$
				t_R Fase Móvel	t_R Lanat.C	t_R Digoxina	t_R Digiloxina	
Si ₁	metanol	1,0	UV 220	1,3	1,3	1,3	1,3	-
Si ₁	etanol	0,8	UV 220	1,7	1,7	1,8	1,8	-
Si ₁	acetato de etila	1,0	UV 275	1,6	2,5	2,6	-	1,1
Si ₁	acet. etilas/n-hexano (93,8:6,2)	1,0	UV 275/IR	1,6	3,0	2,7	-	0,8
Si ₁	acet. etilas/n-hexano (50:50)	1,0	UV 275/IR	1,2	6,1	6,0	6,3	1,0
Si ₁	clorofórmio/metanol (90:10)	1,0	UV 240	1,6	2,1	-	1,6	-
Si ₁	clorofórmio/metanol (60:40)	0,8	UV 240	1,6	2,0	-	1,7	-
Si ₁	clorofórmio/n-hexano (70:30)	1,0	UV 240	1,5	1,5	-	1,4	-
Si ₁	diclorometano/metanol/água (91:8:1)	1,0	UV 250	1,2	-	1,6	1,7	-
Si ₂	etanol	0,8	UV 220	1,0	2,0	2,0	2,1	1,0
Si ₃	etanol	1,0	UV 220	1,6	1,6	1,6	1,6	-
C8	etanol	0,8	UV 220	-	3,3	3,4	3,4	1,1
C8	metanol/água (80:20 v/v)	1,0	UV 240	2,0	2,8	2,9	3,3	1,1
C8	metanol/água (80:20 v/v), pH 7,2 25 mM Na ₂ HPO ₄	1,0	UV 240	2,0	2,8	2,9	3,3	1,2
C8	metanol/água (65:35)	1,0	UV 240	2,0	3,2	3,4	6,4	1,1
C18	etanol	1,0	UV 220	2,2	2,2	2,2	2,4	-
C18	etanol/água (70:30)	1,0	UV 220	2,1	2,2	2,2	2,7	-
C18	acetonitrila/água (40:60)	1,3	UV 220	1,7	2,1	2,6	11,3	2,3
C18	acetonitrila/água (35:65)	1,0	UV 220	2,3	3,5	4,3	31,7	1,7
C18	acetonitrila/metanol/água (25:50:25)	1,0	UV 220	1,9	2,8	3,1	8,0	1,3
C18	metanol/etanol (50:50)	1,0	UV 220	2,2	2,2	2,2	2,3	-
C18	metanol/água (90:10)	1,0	UV 220	2,2	2,3	2,4	2,8	-
C18	metanol/água (80:20 v/v)	1,0	UV 220	2,2	2,4	2,8	4,8	-

Coluna ⁽¹⁾	Fase Móvel (v/v)	Vazão (ml/min)	Detector ⁽²⁾ Comprimento de onda (nm)	Tempo de Retenção (min)				Fator de Separação $\alpha = t_{R2} / t_{R1}$
				t_R Fase Móvel	t_R Lanat C	t_R Dig-provina	t_R Dig-trodina	
C18	metanol/água (80:20 v/v), pH 2,2 25 mM NaH ₂ PO ₄	1,0	UV 240	2,2	-	2,8	4,9	-
C18	metanol/água (72:28)	1,0	UV 220	2,2	2,8	3,3	8,3	1,8
C18	metanol/água (65:35)	1,0	UV 220	2,2	5,2	6,2	35,6	1,3
C18	metanol/água (60:40)	1,0	UV 240	2,2	6,8	8,1	-	1,3
C18	metanol/água (50:50)	1,0	UV 240	2,3	28,2	31,2	-	1,1
C18	metanol/água (55:45)	1,0	UV 240	2,3	16,8	19,0	-	1,2
C18	metanol/água (55:45)	1,5	UV 240	1,6	10,4	12,1	-	1,2
C18	metanol/água (55:45)	2,0	UV 240	1,2	8,0	9,1	-	1,2
C18	metanol/água (55:45), pH 2,0 25 mM NaH ₂ PO ₄	2,0	UV 240	1,2	6,3	7,4	-	1,2
C18	metanol/água (55:45), pH 4,8 25 mM NaAc	2,0	UV 240	1,2	7,5	8,7	-	1,2
C18	metanol/água (55:45), pH 7,5 125 mM Na ₂ HPO ₄	1,2	UV 240	2,0	7,7	9,1	17,1	1,2
CN	metanol/água (80:20 v/v)	1,0	UV 240	2,8	3,1	3,2	3,6	1,3
CN	metanol/água (65:35)	1,0	UV 240	2,8	3,8	3,9	5,6	1,0
CN	metanol/água (65:35), pH 5,1 25 mM NaAc	1,0	UV 240	2,8	3,8	3,9	5,7	1,0
CN	diclorometano/metanol/água (59:40:1)	1,0	UV 250	2,8	-	-	2,9	-
CN	diclorometano/metanol/água (91:8:1)	1,0	UV 250	2,8	5,5	3,7	3,0	-
CN	diclorometano/metanol (99:1)	1,0	UV 250	2,8	3,5	3,3	2,8	-
CN	diclorometano	1,0	UV 250	2,8	4,7	4,6	4,4	-

Observação: (1) Si₁ = coluna de sílica-ResolvTM - 5 µm (150 x 3,9 mm)

Si₂ = coluna de sílica-ligada a grupo amina - Zorbax NH₂ (100x 3,9 mm)

Si₃ = coluna de sílica-ligada a grupo fenil - µBondapakTM Phenyl - 5 µm (150 x 3,9 mm)

CE = coluna de sílica-ligada a grupo octil - UltraphereTM Octyl - 5 µm (250 x 4,6 mm)

C18 = coluna de sílica-ligada a grupo octadecilsiloxano - ZorbaxTM ODS - 5 µm (250 x 4,6 mm)

CN = coluna de sílica ligada a grupo ciano - ZorbaxTM - CN - 5 µm (250 x 4,6 mm)

(2) UV = detector de ultravioleta com comprimento de onda fixo, como indicado

IR = detector de índice de refração

Primeiramente, tentou-se a utilização de etanol, solvente onde todos os compostos apresentam boa solubilidade, como fase móvel frente, às diversas fases estacionárias disponíveis. Porém, a sua utilização levou a resultados desfavoráveis devido à baixa retenção na fase estacionária (S_{11} , S_{13} , C18) ou por baixa seletividade para a separação dos componentes (S_{12} , Cs).

O uso de sílica, fase estacionária bastante utilizada para a separação destes compostos em cromatografia líquida clássica, frente a diversas fases móveis, também mostrou-se inviável. Isso ocorreu porque, mesmo utilizando-se misturas de solventes onde a retenção dos componentes era relativamente alta (acetato de etila/n-hexano 50:50 v/v), a seletividade da separação mantinha-se baixa.

A utilização de coluna de sílica ligada a grupo ciano não mostrou grande vantagem em relação à octadecilsilano, pois a sua utilização como fase reversa levava a menores tempos de retenção e seletividade (fase móvel metanol/água 65:35 v/v) e, mesmo como fase normal, quando se tinha maior retenção (fase móvel diclorometano), ainda observava-se baixa seletividade para a separação.

O uso da fase reversa (C18) mostrou-se satisfatório quando utilizava-se misturas de acetonitrila/água como fases móveis. Porém, devido à maior solubilidade dos compostos em metanol, optou-se inicialmente pela mistura metanol/água (80:20 v/v). Posteriormente, alterou-se as proporções da mistura metanol/água para 65:35 v/v para permitir uma melhor separação do lanatosídeo C e da digoxina e, possivelmente, possibilitar a separação destes por deslocamento ao invés de eluição.

Este mesmo sistema cromatográfico selecionado para os ensaios de cromatografia por deslocamento foi utilizado para a análise das frações coletadas. No entanto, a mistura metanol/água na proporção 65:35 v/v era utilizada somente para a análise das frações contendo lanatosídeo C e digoxina ou os 3 componentes, enquanto para as frações contendo somente digoxina e digitoxina, empregava-se a mistura na proporção 80:20 v/v para reduzir o tempo de análise.

As figuras IV.1 e IV.2 mostram os cromatogramas dos compostos, utilizando-se octadecilsilano como fase estacionária e uma mistura de metanol/água nas proporções 80:20 v/v e 65:35 v/v como fases móveis.

Os resultados dos testes de eluição para a seleção do deslocador encontram-se sumarizados na tabela IV.3. Todos os testes foram realizados utilizando-se fase reversa octadecilsilano e uma mistura metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel a uma vazão de 1,0 ml/min.

Dos oito compostos testados, o octanol foi o único a apresentar maior tempo de retenção que os compostos digitálicos e foi, inicialmente, selecionado como um possível deslocador. Porém, devido à baixa sensibilidade do detector de ultravioleta na detecção deste composto, optou-se pelo uso do detector de índice de refração.

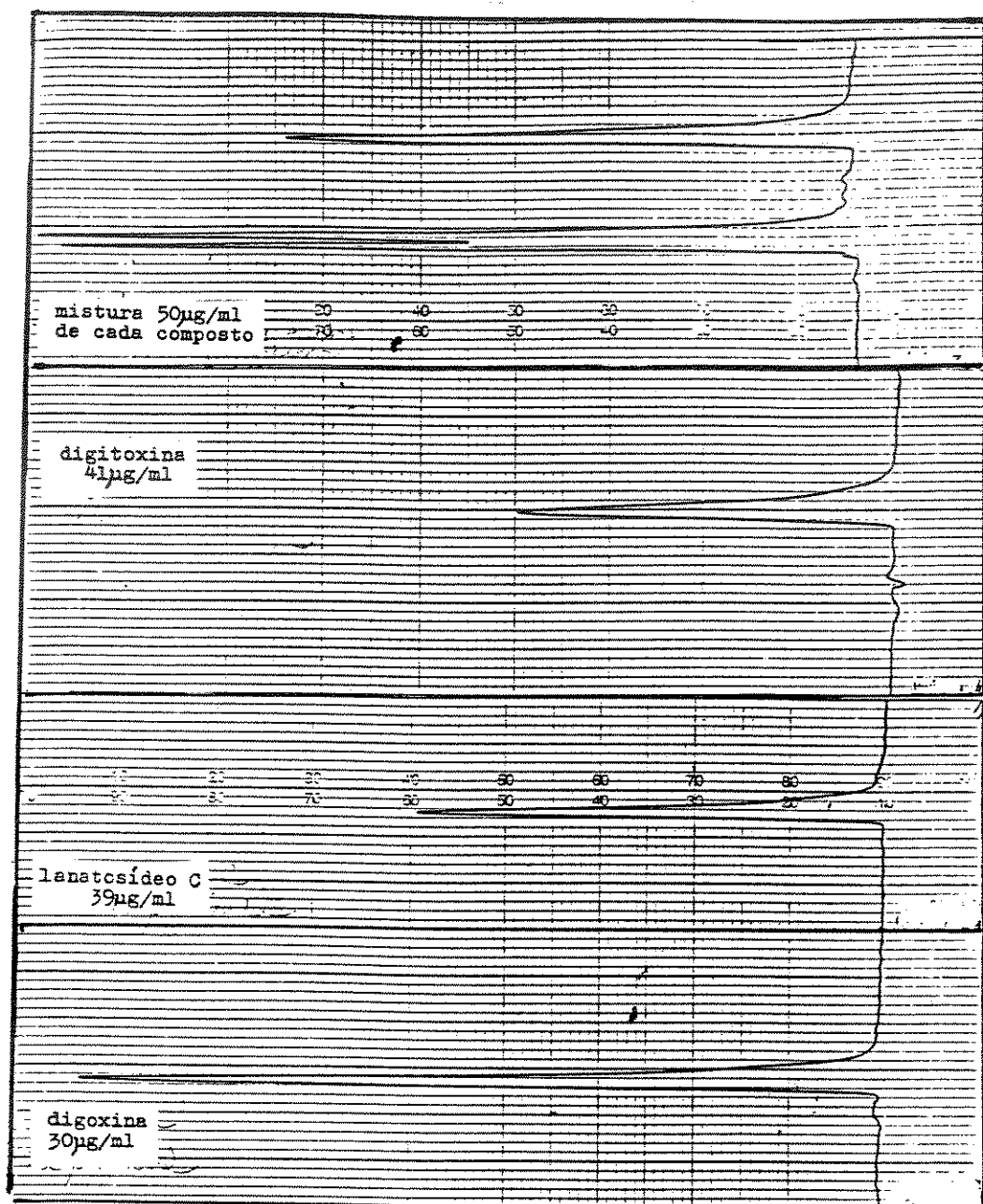


Figura IV.1: Cromatograma do teste de eluição com a fase móvel metanol/água (80:20 v/v), vazão: 1,0 ml/min, velocidade do papel: 1,0 cm/min (xerox redução 64%), fase estacionária: Zorbax ODS (250 x 4,6 mm), detecção: UV 240 nm.

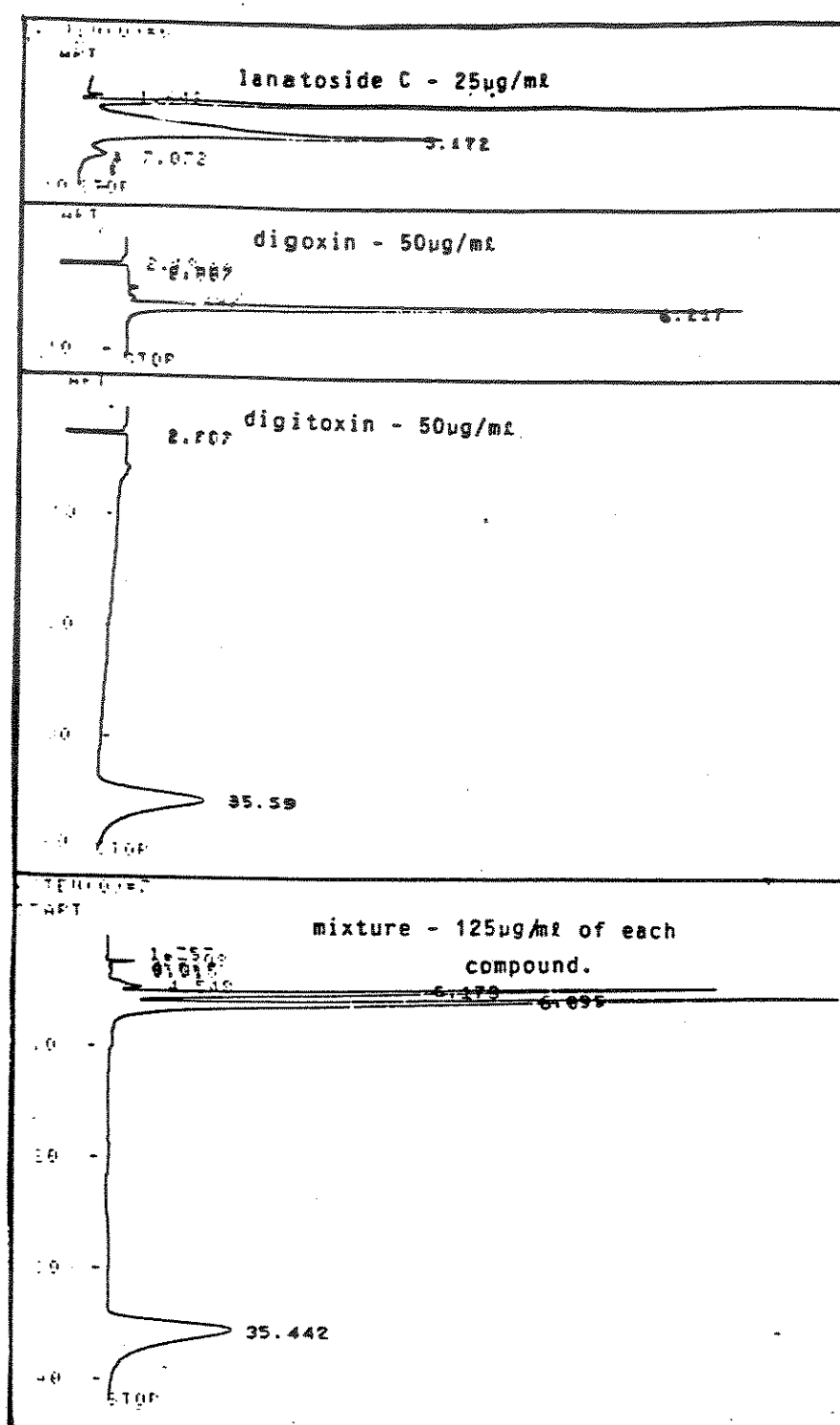


Figura IV.2: Cromatograma do teste de eluição com a fase móvel metanol/água (65:35 v/v), vazão: 1,0 ml/min, fase estacionária: Zorbax ODS (250 x 4,6 mm), detecção: UV 240 nm.

Tabela IV.3: Testes de seleção do deslocador

Compostos	Deteção	Tempo de Retenção (min)
butanol	UV 220 nm	2,8
hexanol	IR	4,8
octanol	UV 220 nm	5,6
cicloexanol	UV 220 nm	3,3
catecol	UV 220 nm	2,7
butoxi-etoxi-etanol	IR	2,4
α,β -glucose	IR	2,3
cetrimida	IR	2,3

Observação: IR = detector de índice de refração
UV 220 nm = detector de ultravioleta a 220 nm

Deve-se ainda ressaltar que, além de apresentar um maior tempo de retenção que o dos compostos a serem deslocados, o octanol também apresenta outras características desejáveis em um possível deslocador, a saber: baixo custo e grande disponibilidade, volatilidade que permite a sua eliminação por destilação a vácuo, facilidade de regeneração da fase estacionária e baixa reatividade com relação aos compostos a serem separados.

IV.1.3 Curvas de Calibração

Após a seleção do sistema cromatográfico a ser utilizado, procedeu-se a medição da curva de calibração dos compostos digitálicos e dos possíveis deslocadores para que este sistema pudesse ser empregado na análise quantitativa das frações coletadas.

A figura IV.3 apresenta as curvas de calibração dos compostos digitálicos: lanatosídeo C, digoxina e digitoxina na faixa de 0 a 400 $\mu\text{g/ml}$ em metanol/água (80:20 v/v). Conforme pode-se observar, as curvas de calibração apresentam boa linearidade na faixa de concentração estudada, sendo que os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram: 0,9996 para o lanatosídeo C, 0,9986 para a digitoxina e 0,9998 para a digoxina.

Os limites de detecção foram obtidos por injeções com diluições sucessivas até que a área sob o pico analisado fosse de duas vezes o valor do ruído de fundo. Os valores assim obtidos foram 2,0 $\mu\text{g/ml}$ para o lanatosídeo C, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para a digitoxina e 1,0 $\mu\text{g/ml}$ para a digoxina. No entanto, durante a análise das frações, a diluição das amostras analisadas era feita de maneira a se obter concentrações na faixa de 25 a 30 $\mu\text{g/ml}$.

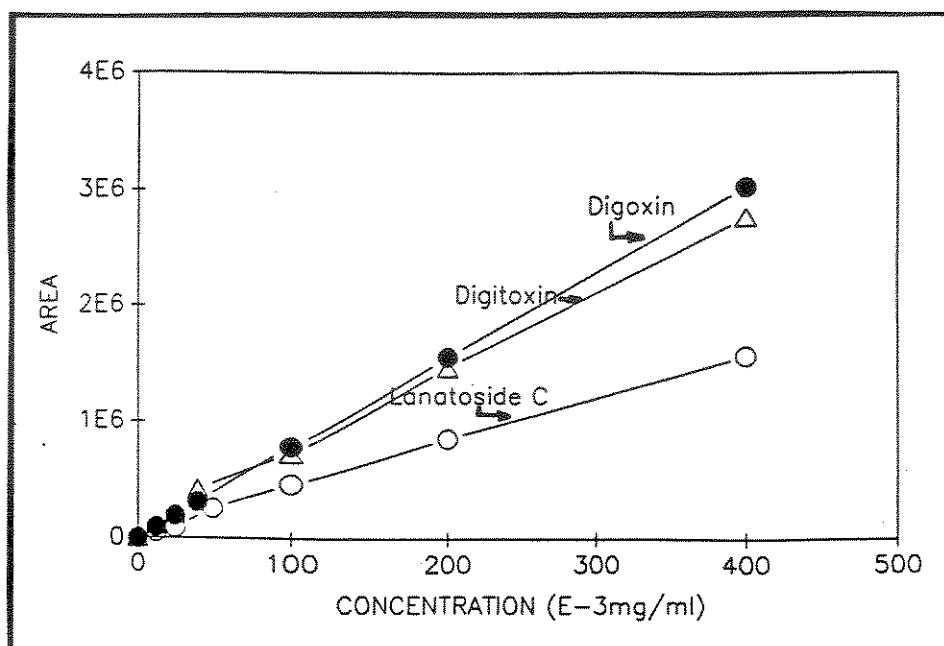


Figura IV.3: Curva de calibração dos compostos digitálicos utilizando-se octadecilsilano e metanol/água (80:20 v/v) a uma vazão de 1,0 ml. Detecção UV 240 nm.

A figura IV.4 apresenta a curva de calibração do octanol, utilizando-se o detector de índice de refração. O valor do coeficiente de correlação para esta reta foi de 0,9926. O limite de detecção foi de 0,3 mg/ml.

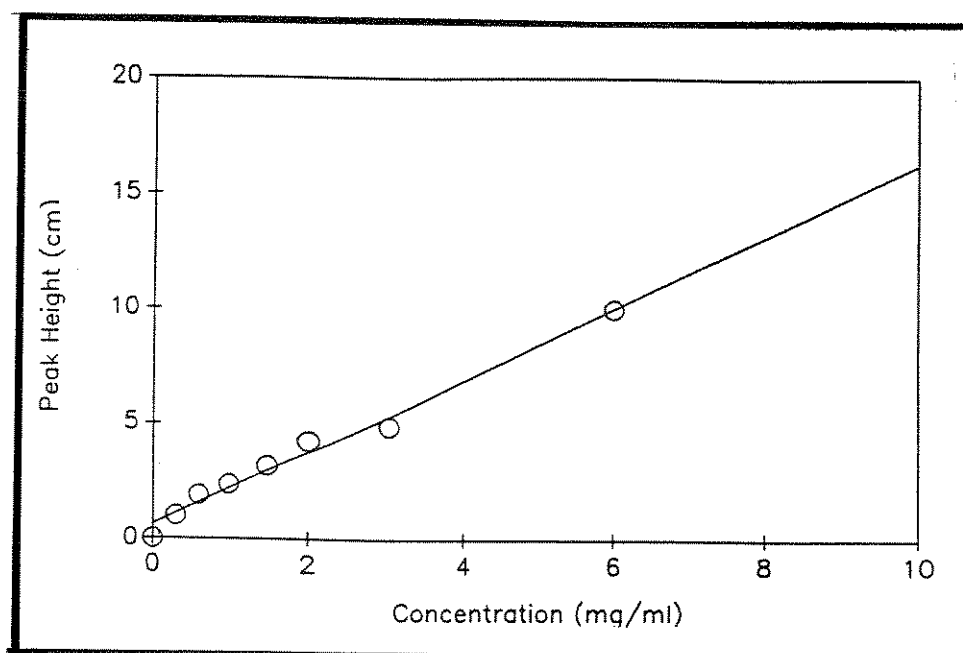


Figura IV.4: Curva de calibração do octanol. Detector, índice de refração. Demais condições idênticas às da figura IV.3.

A curva de calibração do hexanol, que foi empregado em alguns ensaios de deslocamento, usando-se a mesma fase estacionária, uma mistura metanol/água 65:35 v/v como fase móvel e o detector de índice de refração encontra-se na figura IV.5. Seu coeficiente de correlação é de 0,9908 e o limite de detecção do hexanol é de 0,5 mg/ml.

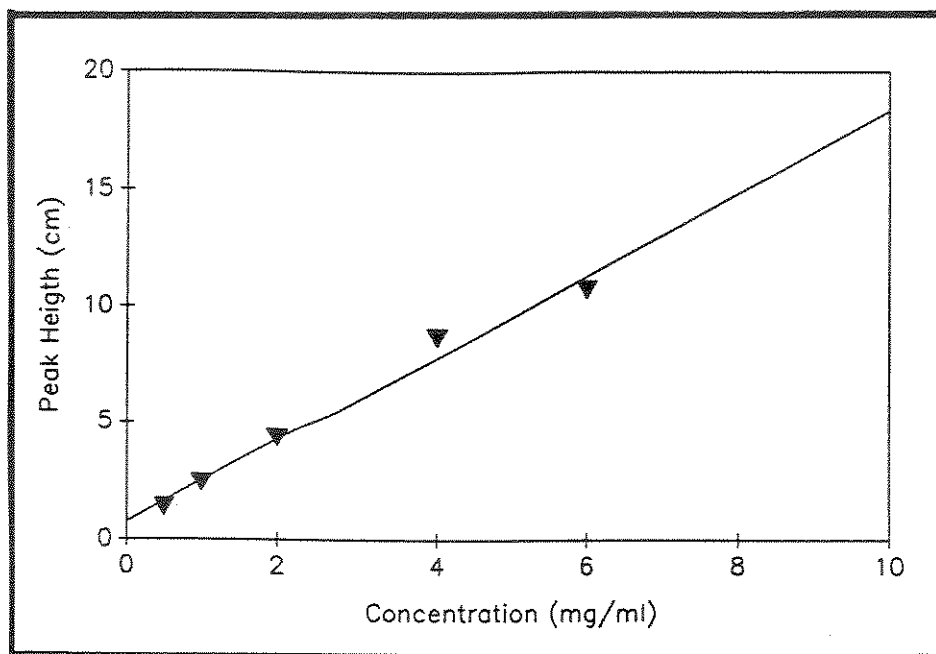


Figura IV.5: Curva de calibração do hexanol. Fase móvel: metanol/água 65:35 v/v. Detector: índice de refração. Demais condições idênticas às da figura IV.3.

IV.2 Medição de Isotermas

Após a seleção do sistema cromatográfico empregando a fase estacionária Zorbax ODS e uma mistura metanol/água na proporção 80:20 v/v como fase móvel e a realização de alguns ensaios de cromatografia por deslocamento, optou-se pela medição das isotermas dos compostos em estudo. Esta opção foi orientada pelo fato de que, dispondo-se das isotermas de adsorção, minimiza-se o número de ensaios de cromatografia por deslocamento necessários à otimização da separação e têm-se maior controle sobre o processo.

Apesar de estar-se trabalhando em uma faixa de concentração relativamente alta (0,3 a 3,2 mg/ml), na qual já se deve observar algum efeito da competição dos compostos pelos sítios ativos do adsorvente, optou-se por técnicas de medição de isotermas individuais. A razão desta escolha é que tais métodos são mais simples e o objetivo de nossa medição é apenas a previsão qualitativa dos resultados de experimentos de cromatografia. Nestes casos, a literatura^(45,59) mostra exemplos de aplicações bem sucedidas de isotermas individuais.

IV.2.1 Medição de isotermas individuais pelo método de tempo de retenção

Devido à grande simplicidade e à potencialidade do modelo do tempo de retenção para a medição de isotermas e a previsão de resultados cromatográficos, optou-se inicialmente pelo emprego desta técnica.

Conforme encontra-se detalhado na revisão bibliográfica, no método do tempo de retenção, a determinação dos melhores valores dos parâmetros da isoterma de Langmuir que aproxima de maneira mais adequada o comportamento de equilíbrio do composto é feita através da medição dos tempos de retenção do soluto em uma injeção em escala analítica e em uma injeção em grande escala (com concentração conhecida), sabendo-se a eficiência da coluna (medida com relação ao composto analisado) e o tempo de retenção da fase móvel.

A tabela IV.4 mostra os valores obtidos para os parâmetros a e b da isoterma de Langmuir, no sistema utilizado, e a figura IV.6 traz as respectivas isotermas de adsorção.

Uma vez que o método do tempo de retenção corresponde a uma solução analítica do modelo ideal de cromatografia para o cálculo dos melhores parâmetros a e b da isoterma de Langmuir, esse possui algumas restrições, a saber:

- a isoterma deve ser langmuiriana, caso contrário o valor do parâmetro b varia com o tamanho da amostra injetada;
- a fase móvel deve ser um solvente puro ou contendo outros solventes ou aditivos que são muito mais fracamente retidos que o composto estudado, pois neste método negligencia-se o balanço de massa e assume-se o problema de isoterma de um componente sem competição das moléculas do solvente para adsorção nos sítios da fase estacionária;
- o fator de carregamento (L_f) deve possuir um valor mínimo de 1%.

Tabela IV.4: Parâmetros a e b da isoterma de Langmuir, obtidos pelo método do tempo de retenção.

Composto	a	b (ml/mg)
lanatosídeo C	0,22	0,038
digoxina	0,32	0,037
digitoxina	1,66	0,213
1-butanol	0,39	0,001
1-octanol	1,90	0,025

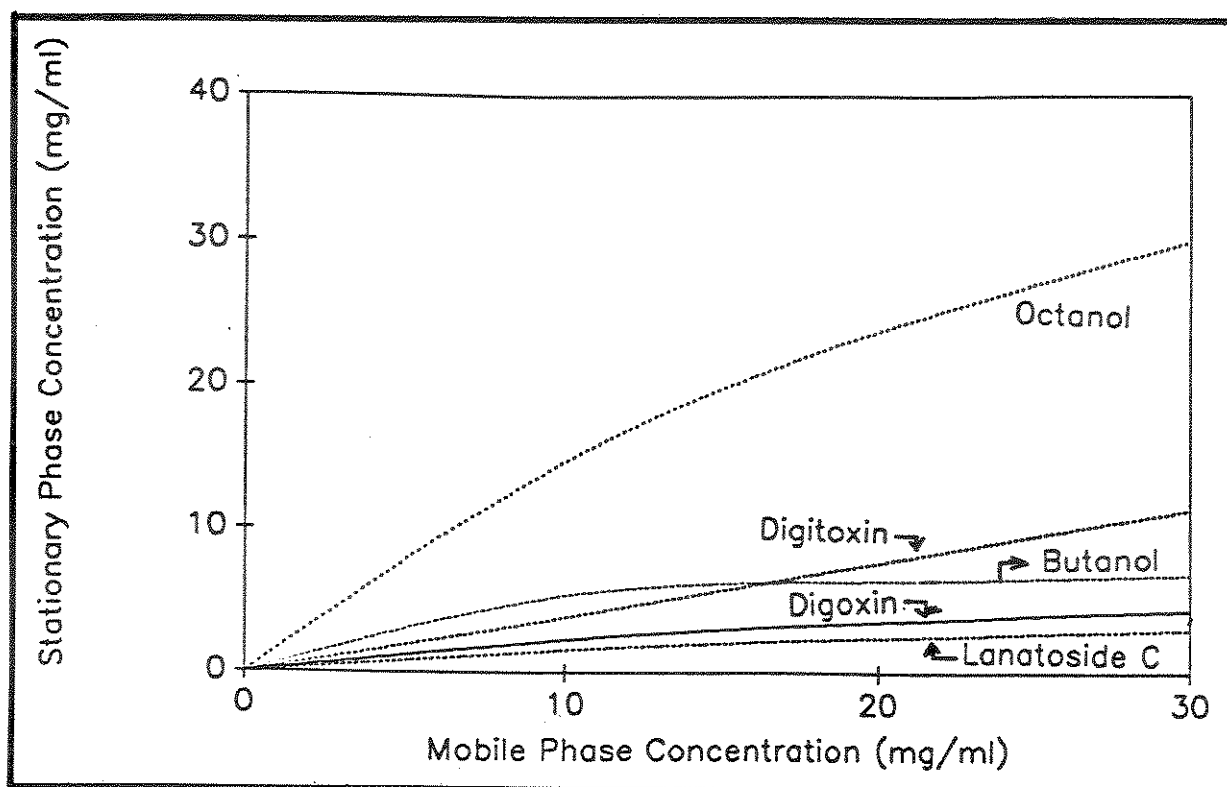


Figura IV.6: Isothermas de adsorção medidas pelo método do tempo de retenção a 25°C. Fase móvel: metanol/água 80:20 v/v. Vazão: 1,0 ml/min. Fase estacionária: Zorbax ODS 5 μ m (250x4,6 mm). Detecção: índice de refração para octanol e butanol e ultravioleta a 240 nm para os demais compostos.

No entanto, devido à solubilidade relativamente baixa da digoxina, da digitoxina e do lanatosídeo C na fase móvel empregada, o valor do fator de carregamento foi inferior a 1% (faixa de 0,4 a 0,8%), o que acarreta em um erro muito grande na leitura dos valores do gráfico adimensional (vide revisão bibliográfica) para o cálculo do parâmetro b da isoterma de Langmuir.

Além disto, a suposição de que a fase móvel não compete pelos sítios ativos da fase estacionária pode não ser válida para este sistema, visto que a retenção dos compostos analisados não é muito alta.

Deve-se, ainda, ressaltar que as isothermas medidas pelo método do tempo de retenção não explicam os resultados obtidos nos experimentos iniciais de deslocamento, nos quais uma solução de octanol com concentração na faixa de 24 a 30 mg/ml era capaz de deslocar a digitoxina no sistema cromatográfico utilizado.

Desta forma, optou-se pela nova medição das isothermas pelo método de análise frontal.⁽⁵⁾

IV.2.2 Medição de Isotermas Individuais pelo Método de Análise Frontal

O método de análise frontal para a medida de isotermas individuais é um método empírico que apesar de requerer um maior número de medidas e a disponibilidade de maior quantidade de soluto, possibilita a obtenção de pontos discreto da isoterma de adsorção, não tendo sua aplicação restrita pelas hipóteses envolvidas no modelo de adsorção utilizado.

Inicialmente, mediu-se a isoterma de adsorção do octanol no sistema Zorbax ODS/metanol-água (80:20 v/v), em duplicata, para a checagem da reprodutibilidade do método de análise frontal. Os resultados encontram-se na tabela IV.5.

Tabela IV.5: Medida da isoterma de adsorção do octanol no sistema Zorbax ODS/Metanol-água (80:20 v/v) pelo método de análise frontal.

Concentração de octanol na fase móvel (mg/ml)	Valores obtidos para a concentração na fase estacionária (mg/ml)	
	1ª medição	2ª medição
3,5	7,36	7,00
7,0	13,44	12,82
14,70	24,06	23,28
20,00	29,67	28,75
25,00	33,95	33,14
30,00	37,43	36,56

De acordo com os dados apresentados na tabela IV.5, pode-se notar que o desvio das medidas é pequeno, o que mostra a boa reprodutibilidade do método. Deste modo, optou-se pela medição das demais isotermas em uma única vez, devido ao longo tempo envolvido em cada medição e a indisponibilidade de soluto em quantidade suficiente para medidas em duplicata.

A figura IV.7 mostra as isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal. Conforme pode ser observado na figura IV.7, a faixa de concentração utilizada para a medida das isotermas de digoxina, digitoxina e lanatosídeo C foi relativamente pequena, devido à baixa solubilidade destes compostos na fase móvel empregada. Porém, este fato não inviabiliza o uso destas isotermas na previsão dos resultados obtidos por cromatografia por deslocamento, uma vez que, neste caso, esta é a faixa de concentração útil para tais experimentos.

Para a medição de isotermas pelo método de análise frontal, também pode-se utilizar um sistema miniaturizado que envolve a preparação de uma coluna com dimensões de 50,0 x 1,18 ou 40,5 x 1,18 mm⁽⁹⁾, o qual envolve um consumo bem menor de soluto. No entanto, este procedimento não pode ser empregado neste caso devido à baixa retenção dos compostos no sistema cromatográfico empregado, o que resultaria em um grande erro na medida dos volumes de retenção da frente em colunas de dimensões menores ("narrow bore").

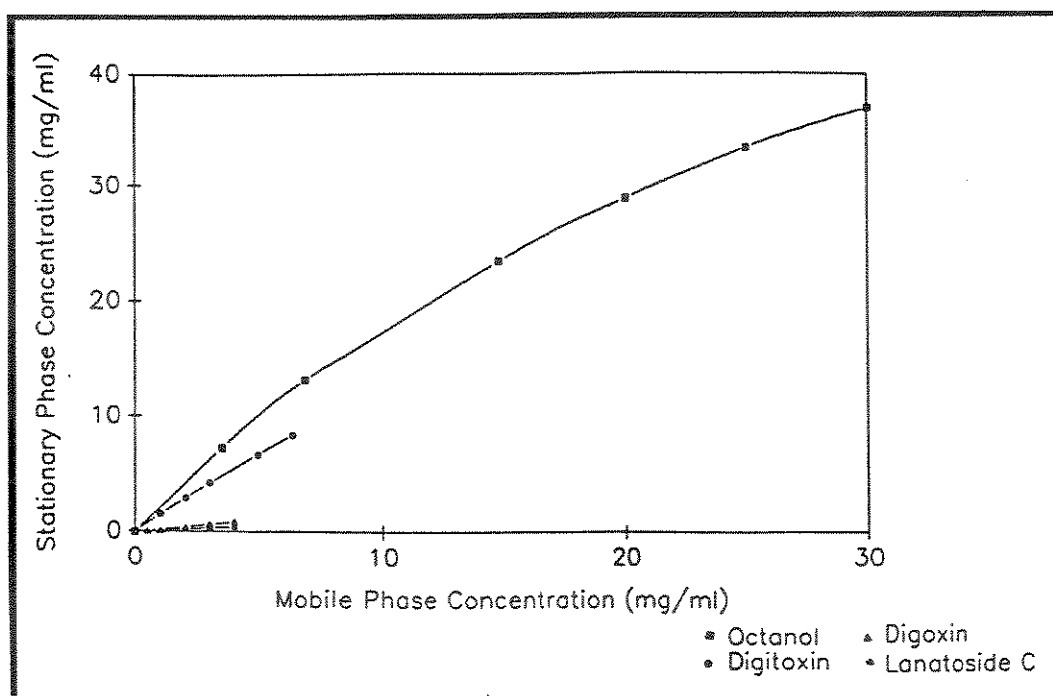


Figura IV.7: Isotermas de adsorção medidas pelo método de análise frontal a 25°C. Fase móvel: metanol/água 80:20 v/v. Fase estacionária: Zorbax ODS 5 µm (250 x 4,6 mm). Detecção: índice de refração para o octanol e ultravioleta a 265 nm para os demais compostos. Vazão: 0,25 ml/min.

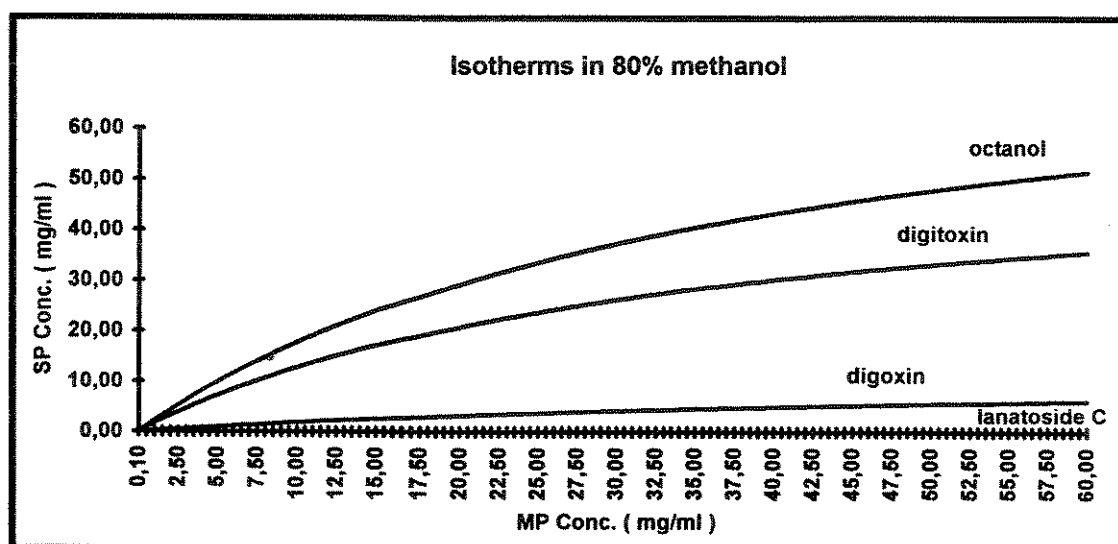


Figura IV.8: Extrapolação das isotermas de adsorção (modelo de Langmuir) medidas pelo método de análise frontal, utilizando-se a mistura metanol-água (80:20 v/v) como fase móvel e Zorbax ODS como fase estacionária. Demais condições descritas na figura IV.7

Deve-se citar que a extrapolação da isoterma do octanol para concentrações de até 60 mg/ml (figura IV.8) mostrou que, mesmo nestas condições, tanto a digoxina quanto o lanatosídeo C continuariam sofrendo somente eluição, isto é, suas isotermas ainda não seriam interceptadas pela linha operacional.

Estes valores de extrapolação de isotermas (figura IV.8) devem ser analisados com uma certa restrição, uma vez que foram obtidos utilizando-se o modelo de adsorção de Langmuir e valores baixos de concentração (faixa de 0,5 a 6,5 mg/ml para os compostos digitálicos).

Com base nos resultados obtidos, optou-se pela realização de novos testes de eluição visando a identificação de um novo sistema cromatográfico (fase estacionária/fase móvel) mais apropriado para a separação de digoxina, digitoxina e lanatosídeo C em escala preparativa por cromatografia por deslocamento.

O novo sistema, selecionado de acordo com os critérios de solubilidade e retenção, envolvia a mesma fase estacionária, Zorbax ODS, e a mistura metanol/água na proporção 65:35 v/v como fase móvel. Realizou-se, então, a nova medição das isotermas de adsorção individuais pelo método de análise frontal neste outro sistema cromatográfico. As isotermas obtidas são apresentadas na figura IV.9.

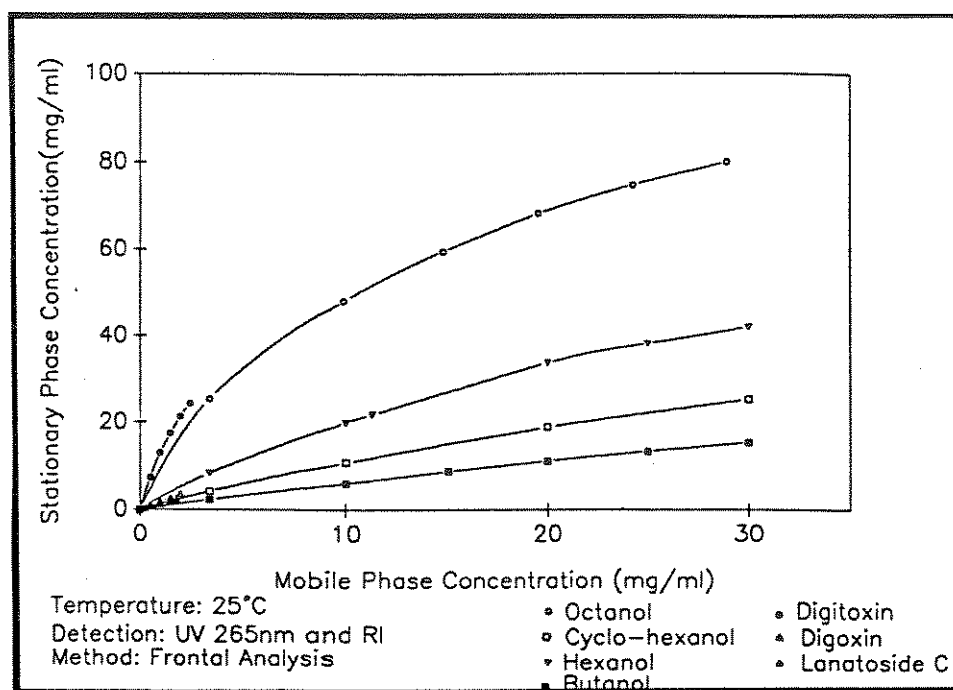


Figura IV.9: Isotermas de adsorção, medidas pelo método de análise frontal a 25°C. Fase móvel: metanol/água (65:35 v/v). Vazão: 0,25 e 0,50 ml/min, conforme o tempo de retenção do composto. Fase estacionária: Zorbax ODS 5 μ m (250 x 4,6 mm). Detecção: índice de refração para o octanol, hexanol, ciclohexanol e butanol e ultravioleta a 265 nm para os demais compostos.

Pode-se observar, na figura IV.9, que a faixa de concentração das isotermas da digoxina, da digitoxina e do lanatosídeo C foi menor no caso do uso da mistura metanol/água 65:35 v/v do que no caso de uso da mistura na proporção 80:20 v/v, este fato é decorrente da menor solubilidade destes compostos nesta nova fase móvel.

A análise da figura IV.9 mostra, também, que, a 65% de metanol, a isoterma da digitoxina fica acima da do octanol, a baixas concentrações. Porém, extrapolando-se a isoterma da digitoxina para concentrações mais elevadas (até 60 mg/ml), observa-se que devido à sua maior curvatura em relação à isoterma do octanol, haverá interseção das duas isotermas numa concentração de cerca de 6,5 mg/ml na fase móvel (figura IV.10).

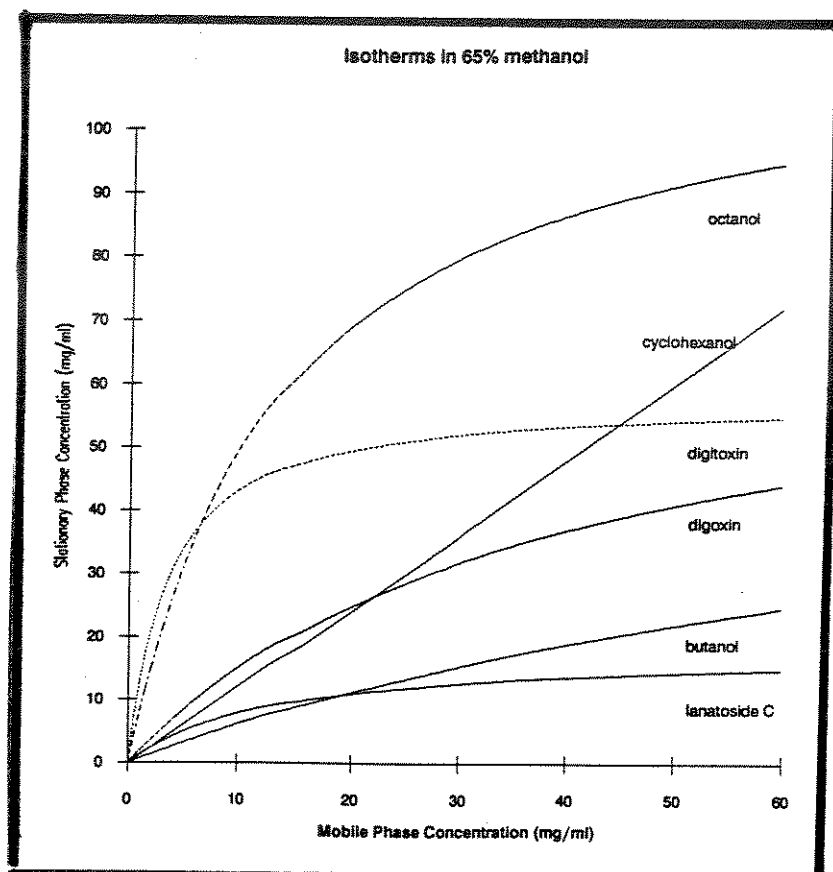


Figura IV.10: Extrapolação das isotermas de adsorção (modelo de Langmuir) medidas pelo método de análise frontal, utilizando-se metanol/água (65:35 v/v) como fase móvel e Zorbax ODS como fase estacionária. Demais condições descritas na figura IV.9.

Conforme citado anteriormente, estes valores de extrapolação de isotermas devem ser analisados com uma certa restrição, uma vez que foram obtidos utilizando-se o modelo de adsorção de Langmuir e valores baixos de concentrações, os quais podem ainda estar na porção linear da isoterma. No entanto, a análise qualitativa destes resultados mostra que numa faixa de concentração baixa (cerca de 15 mg/ml), o octanol não poderá funcionar como deslocador da digitoxina e que mesmo em concentrações de octanol a nível de 60 mg/ml, este não atuará como deslocador para a digoxina e o lanatosídeo C.

O fato de as isotermas individuais da digitoxina e do octanol se interceptarem não impediria, por si só, o emprego de octanol como deslocador desta, desde que fosse selecionada uma concentração conveniente para tal. Conforme observado por Hórvath e colaboradores⁽¹¹⁷⁾ na separação de uma mistura binária, quando as isotermas individuais dos compostos a serem separados cruzam, pode-se observar a formação de três regiões em cromatografia por deslocamento. Numa região a concentrações suficientemente baixas, os dois compostos são separados e coletados na mesma ordem obtida em cromatografia por eluição. Em uma segunda região, a concentrações suficientemente altas, prevê-se a separação das bandas, mas com o aparecimento dos compostos em ordem inversa. Na terceira região, a concentrações intermediárias, a separação completa não é possível e, na condição isostática, obtém-se a mistura dos compostos. Com base nesses resultados, optou-se pelo estudo de novos compostos que pudessem atuar como espaçadores para a digoxina e o lanatosídeo C no sistema cromatográfico selecionado.

O primeiro composto testado foi o butanol, pois nos testes de eluição no sistema cromatográfico selecionado, o seu tempo de retenção era maior do que o da digoxina e o do lanatosídeo C. Todavia, a isoterma do butanol fica abaixo da isoterma da digoxina, o que impossibilita seu uso como deslocador desta.

Um outro componente testado foi o cicloexanol, mas, possivelmente devido à sua estrutura cíclica, a capacidade da fase estacionária para este componente é bem mais elevada que para os demais compostos, o que faz com que a faixa de linearidade de sua isoterma seja bem mais extensa. Desta maneira, mesmo na extrapolação a uma concentração de 60 mg/ml na fase móvel, ainda se obtém um perfil de linha reta para a isoterma do cicloexanol. Conseqüentemente, há interseção das isotermas do cicloexanol e da digoxina, assim como da digitoxina. Além disto, nenhuma linha operacional traçada na faixa de concentração de 0 a 60 mg/ml de cicloexanol intercepta a isoterma do lanatosídeo C, o que implica que o cicloexanol não pode atuar como deslocador deste no sistema em estudo.

Por outro lado, a isoterma do hexanol (figura IV.9) mostra que, apesar deste não poder ser utilizado como deslocador para a digitoxina, em concentrações acima de 25 mg/ml, ele pode ser usado como deslocador da digoxina e, possivelmente, do lanatosídeo C. Com base nestes resultados, e no fato de que a fase estacionária é facilmente regenerada após o uso de hexanol como deslocador, deu-se início a novos ensaios de cromatografia por deslocamento, utilizando hexanol como deslocador.

IV.3 Cromatografia por Deslocamento

IV.3.1 Regeneração e Avaliação da Eficiência da Coluna

Após cada ensaio de cromatografia por deslocamento ou de medição de isoterma, a coluna era regenerada por passagem de metanol e, ocasionalmente, media-se sua eficiência para verificar-se se esta ainda estava em condições de uso. Optou-se pela utilização de

digitoxina 400 µg/ml como composto para avaliação da eficiência da coluna, para ter-se uma medida mais próxima das condições reais de uso da mesma.

A tabela IV.6 mostra alguns valores de eficiência da coluna obtidos após a realização de ensaios de deslocamento. Os resultados indicam uma queda de cerca de 50% da eficiência da coluna após a realização de dez ensaios de cromatografia por deslocamento, quando a mesma foi substituída por uma nova coluna equivalente.

Tabela IV.6: Eficiência da coluna cromatográfica usada em ensaios de deslocamento. Fase estacionária: Zorbax ODS, deslocador: octanol ou hexanol, regenerante: metanol 1,0 ml/min, composto teste: digitoxina 400 µg/ml, fase móvel: metanol/água (80:20 v/v) 0,75 ml/min.

Nº de ensaios de deslocamento	Tempo de regeneração (h)	Nº de pratos teóricos/metro
0	0	8220
1	0,5	7570
4	1,5	8630
5	2,0	9520
6	2,0	7670
10	1,0	4660

IV.3.2 Ensaios de Cromatografia por Deslocamento

Conforme citado anteriormente, iniciou-se os ensaios de cromatografia por deslocamento utilizando-se a mistura metanol/água (80:20 v/v) como fase móvel, a qual foi selecionada de acordo com os critérios de boa solubilização e separação dos compostos em escala analítica.

A figura IV.11 mostra o resultado do ensaio de controle, no qual a mistura digoxina/digitoxina foi separada por eluição para que pudesse servir como referência para as separações por deslocamento. Observa-se o comportamento típico de eluição sobrecarregada, onde além de ter-se um grande número de frações, a digoxina apresenta uma longa cauda que resulta na contaminação de grande parte da digitoxina. Deve-se ressaltar que, na representação esquemática empregada, cada uma das barras verticais indica uma fração coletada e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

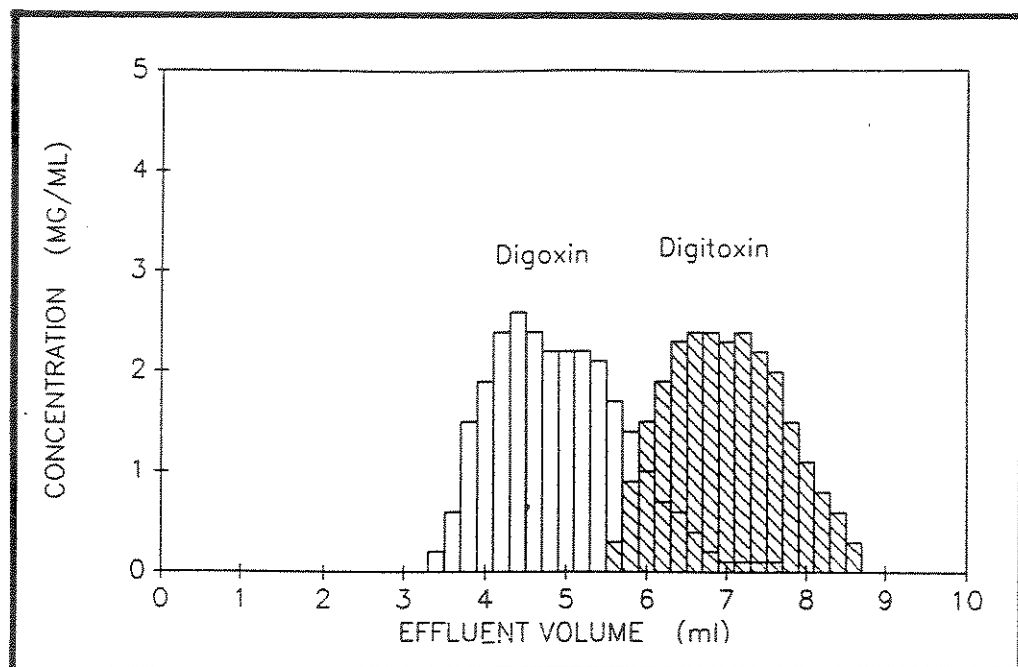


Figura IV.11: Separação da mistura digoxina/digitoxina por eluição em coluna Zorbax ODS (250 x 4,6 mm). Fase móvel: CH₃OH/H₂O (80:20 v/v) a 0,2 ml/min. Detecção: UV 220 nm. Amostra: 2,0 ml de solução 2,6 mg/ml de digoxina e 2,4 mg/ml de digitoxina na fase móvel. Temperatura: 25°C.

O primeiro experimento de cromatografia por deslocamento encontra-se representado esquematicamente na figura IV.12. Neste ensaio utilizou-se a mistura lanatosídeo C/digoxina/ digitoxina. Observa-se que o volume inicial de eluição da digoxina, assim como a cauda por ela apresentada, são semelhantes ao ensaio de controle por eluição, mostrando que a concentração do deslocador deve estar abaixo da concentração necessária para o deslocamento deste componente. No entanto, em uma das frações a digoxina sofreu um efeito de deslocamento, apresentando o dobro de sua concentração original. Com relação à digitoxina, esta também não está sendo deslocada, apresentando-se mais concentrada em apenas algumas das frações, e o seu volume inicial de eluição não apresenta diferença significativa com relação ao ensaio de controle. Deve-se ressaltar que o deslocamento de um componente da amostra pelo deslocador é normalmente evidenciado pela redução do volume de efluente em que este é coletado e pela alteração de sua concentração determinada pela linha operacional. Tais observações confirmam a hipótese de que a concentração do deslocador encontra-se abaixo da necessária. Esta fato é confirmado pelas isotermas dos componentes em questão (figura IV.7), onde observa-se que uma solução de octanol com concentração de 10 mg/ml não é capaz de deslocar a digitoxina, mas aumentando-se a concentração do deslocador para 23,7 mg/ml, nota-se o deslocamento deste composto pelo octanol. Além disso, houve a eluição simultânea da digoxina e do lanatosídeo C, o que resultou na utilização da mistura contendo apenas digoxina/digitoxina para os experimentos iniciais de cromatografia por deslocamento, os quais visavam o estudo dos efeitos da variação do comprimento da coluna, da temperatura e da concentração do deslocador.

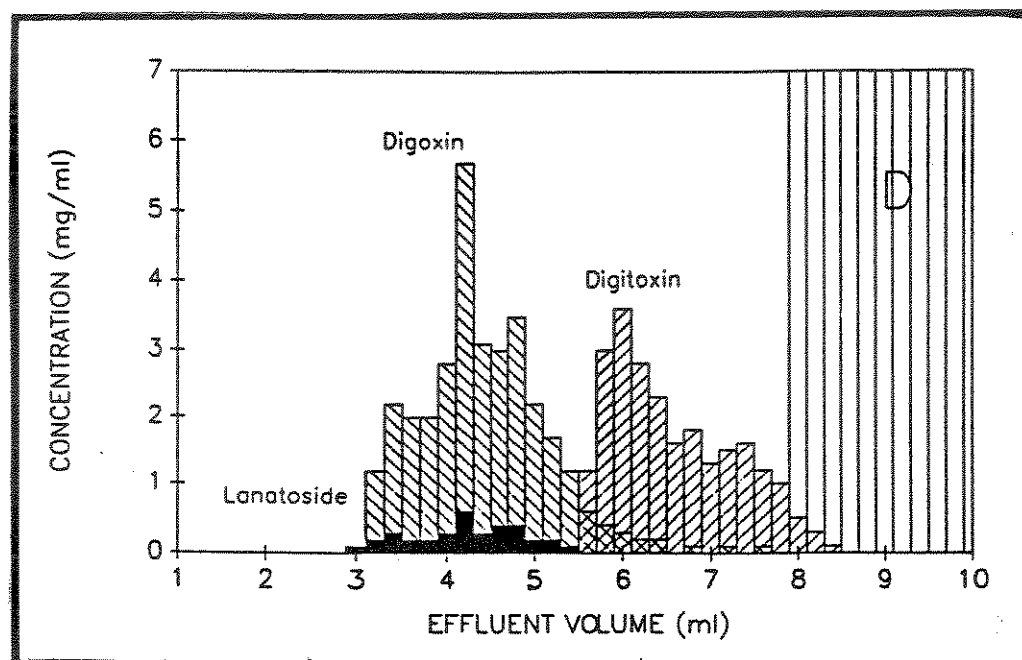


Figura IV.12: Separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina por cromatografia por deslocamento. Amostra: 2,0 ml de solução 0,3 mg/ml de lanatosídeo C, 2,6 mg/ml de digoxina e 3,0 mg/ml de digitoxina na fase móvel. Deslocador: octanol 10 mg/ml na fase móvel. Outras condições como na figura IV.11.

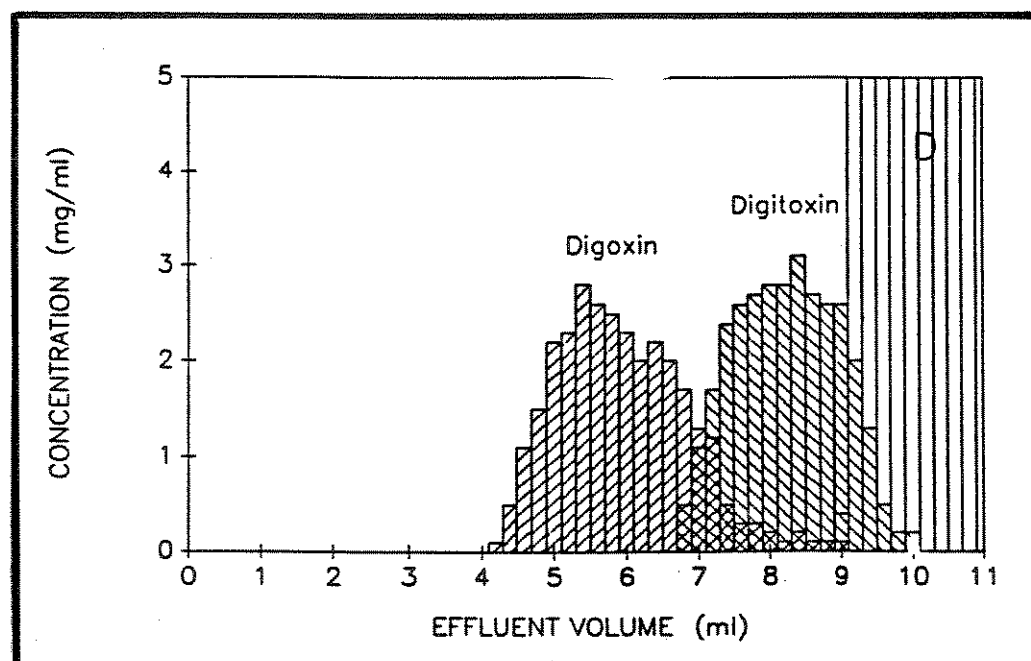


Figura IV.13: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (2,0 mg/ml)/digitoxina (2,4 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 25°C, usando octanol 22,1 mg/ml, na fase móvel, como deslocador. Outras condições como na figura IV.11.

A figura IV.13 apresenta a representação esquemática de um experimento de separação por deslocamento da mistura digoxina/digitoxina. Sabe-se que como a concentração do octanol, usado como deslocador, é maior na figura IV.13 que na IV.12, o volume inicial de eluição da digoxina deveria ser menor neste último exemplo, o que não ocorreu. Acredita-se que tal fato seja resultante de algum problema experimental, como por exemplo, a não regeneração apropriada da coluna ou algum desvio na preparação da fase móvel. Neste ensaio, o grande número de frações de ambos os componentes indica uma provável eluição, mas em algumas das frações da digoxina e da digitoxina, nota-se um efeito de concentração que não foi observado no experimento de controle (figura IV.11), sugerindo que uma mistura de mecanismos de desenvolvimento esteja operando na separação. Atentando-se para as isotermas medidas pelo método de análise frontal (figura IV.7), nota-se que o valor de concentração do octanol utilizado neste ensaio está muito próximo do valor mínimo para a ocorrência de deslocamento da digitoxina. Observa-se, ainda, que a maioria das frações de digitoxina estão contaminados com digoxina.

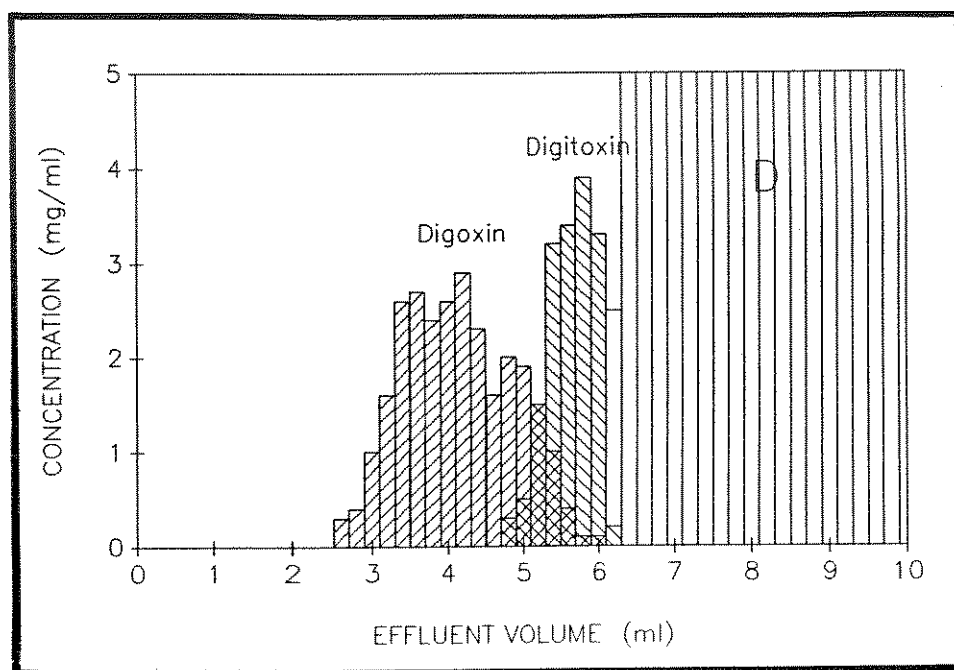


Figura IV.14: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (1,9 mg/ml)/digitoxina (2,1 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 40°C, usando octanol 26,6 mg/ml, na fase móvel, como deslocador. Outras condições como na figura IV.11.

O efeito do aumento da temperatura de 25 para 40°C, simultaneamente com o aumento da concentração do deslocador, é mostrado na figura IV.14, onde observa-se uma diminuição tanto no volume inicial de eluição da digoxina como no da digitoxina. Nota-se, também, que a digitoxina foi coletada em um número bem menor de frações mais concentradas, evidenciando o seu deslocamento pelo octanol. No entanto, observa-se que não há boa separação dos compostos, o que pode ser devido a um comprimento de coluna insuficiente para o desenvolvimento completo do deslocamento, ou seja, o não atingimento da condição isostática.

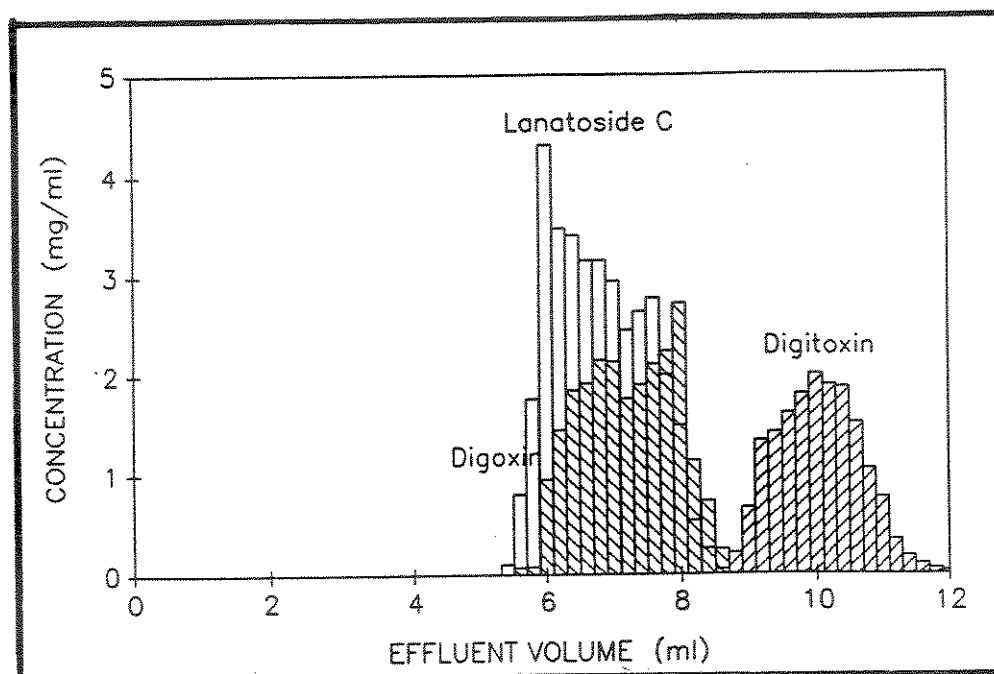


Figura IV.15: Separação de 2,0 ml da mistura lanatosídeo C (2,3 mg/ml)/digoxina (2,0 mg/ml)/digitoxina (3,2 mg/ml) por eluição a 45°C, usando duas colunas recheadas com octadecilsilano (Zorbax ODS) ligadas em série (500 x 4,6 mm). Fase móvel CH₃OH/H₂O (80:20 v/v) a 0,2 ml/min. Detecção: UV 220 nm..

A figura IV.15 mostra um novo experimento de controle por eluição onde tentou-se a separação da mistura lanatosídeo C/digoxina/digitoxina com duas colunas recheadas com octadecilsilano ligados em série (comprimento total da coluna: 500 mm). Conforme pode ser observado, mesmo com a coluna mais longa, não é possível a separação do lanatosídeo C e da digoxina neste sistema cromatográfico. Desta maneira, optou-se pela manutenção do uso da mistura digoxina/digitoxina para os experimentos de cromatografia por deslocamento.

Um experimento de cromatografia por deslocamento empregando-se uma coluna mais longa, encontra-se representado na figura IV.16. A comparação deste ensaio com o apresentado na figura IV.14, mostra o efeito do aumento do comprimento da coluna de 250 para 500 mm. Este aumento propiciou uma boa separação dos componentes, levando inclusive a um grande aumento na concentração da digitoxina que sofreu deslocamento pelo octanol. Porém, a digoxina foi separada por eluição, apesar de algumas de suas frações apresentarem aumento de concentração indicativo de um possível efeito de deslocamento. O resultado obtido neste ensaio está de acordo com as previsões feitas a partir das isotermas medidas pelo método de análise frontal (figura IV.7), onde para uma linha operacional com concentração de octanol de 23,7 mg/ml, a digoxina e o lanatosídeo C sofreriam apenas eluição, já que suas isotermas não intersectam a linha operacional.

Os dois experimentos subsequentes objetivaram a seleção de uma condição na qual ambos os componentes fossem deslocados.

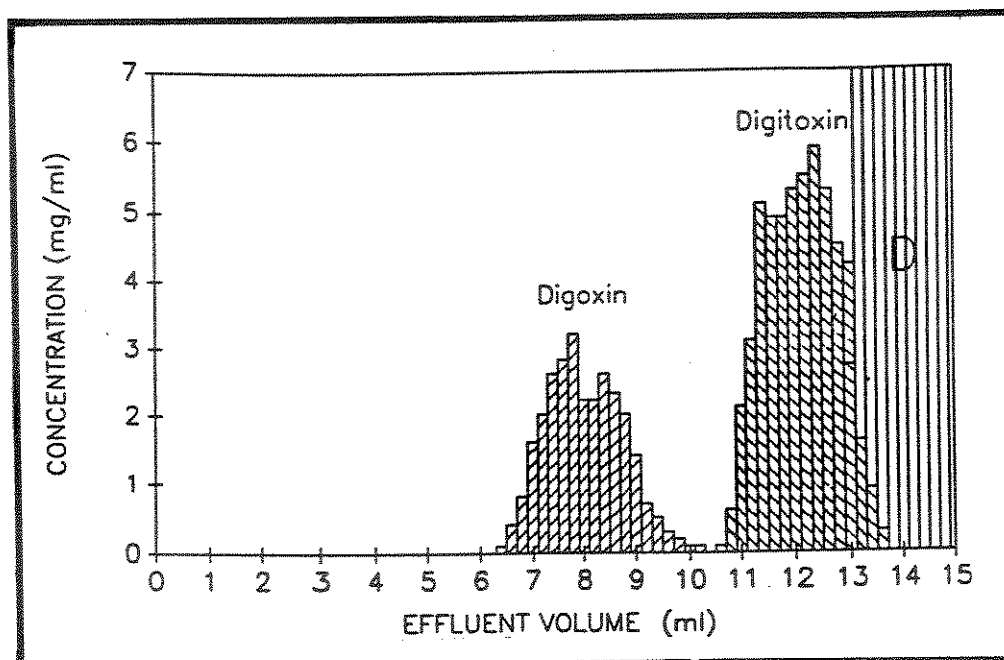


Figura IV.16: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (1,9 mg/ml)/digitoxina (2,9 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se octanol 23,7 mg/ml como deslocador. Demais condições como na figura IV.15.

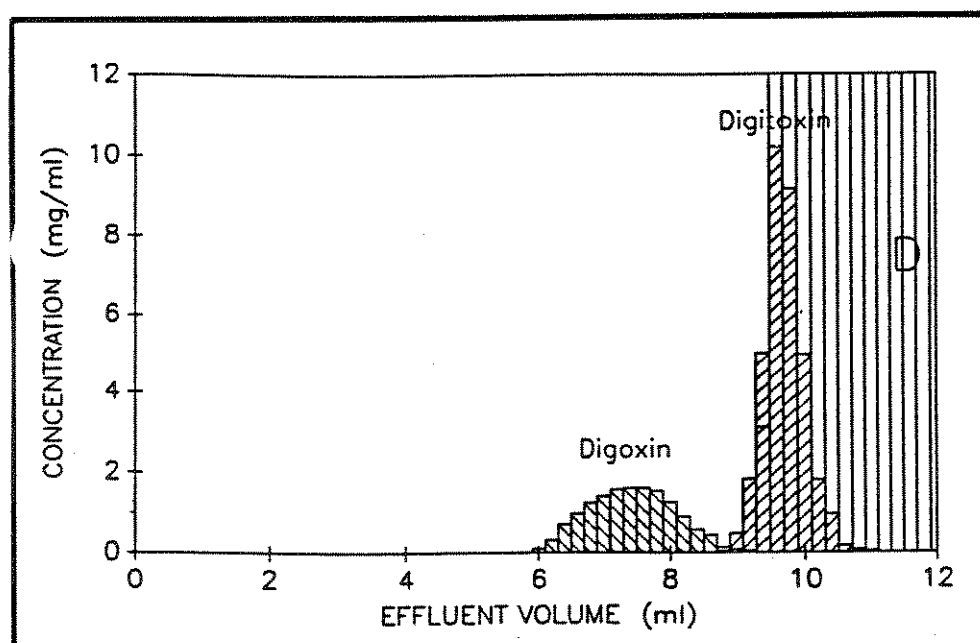


Figura IV.17: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (1,3 mg/ml)/digitoxina (3,2 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se octanol 56,4 mg/ml, na fase móvel, como deslocador. Demais condições como na figura IV.15.

Na figura IV.17, observa-se que o aumento da concentração do deslocador de 23,7 para 56,4 mg/ml teve um grande efeito na digitoxina, a qual foi deslocada e saiu da coluna em um número bem menor de frações mais concentradas. Além disso, o seu volume inicial de coleta é bastante inferior, passando de 10,1 para 8,8 ml. Com relação à digoxina, nota-se a sua nítida eluição, já que seu volume inicial de coleta sofreu uma alteração mínima e sua obtenção foi feita em um grande número de frações, sendo que apenas cinco delas apresentam um ligeiro aumento de concentração.

No experimento representado na figura IV.18, a concentração do deslocador foi elevada ainda mais, e a temperatura foi aumentada de 25 para 45°C, visando o deslocamento da digoxina. Todavia, verifica-se que mesmo nestas condições a digoxina não sofre deslocamento pelo octanol. Este fato está de acordo com o resultado obtido com a extrapolação das isotermas obtidas nestas condições (figura IV.8).

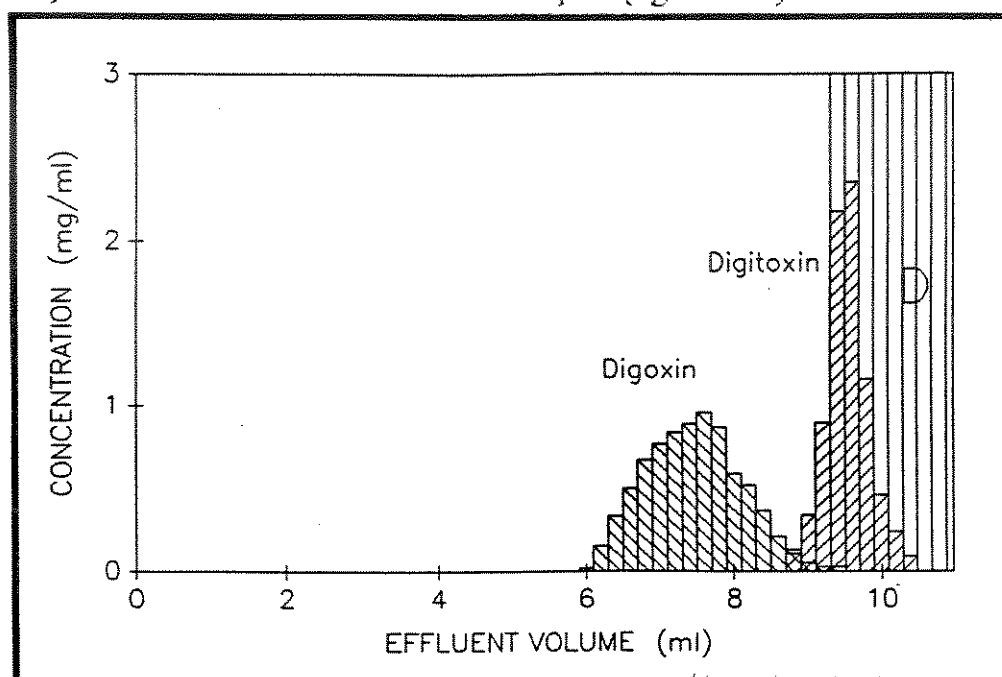


Figura IV.18: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (0,83 mg/ml)/digitoxina (0,84 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 45°C, empregando-se octanol 74,4 mg/ml, na fase móvel, como deslocador. Demais condições como na figura IV.15.

Apenas para fins comparativos, a figura IV.19 apresenta um experimento da cromatografia por deslocamento onde utilizou-se uma concentração de octanol abaixo da necessária para a ocorrência de deslocamento, conforme pode ser observado pelo perfil característico de eluição do pico da digitoxina. Esperava-se, porém, que o volume inicial de coleta da digitoxina ocorresse a um valor bem mais alto que os dos experimentos onde este composto sofreu deslocamento (figuras IV.16, IV.17, IV.18). Acredita-se que a não ocorrência deste fato seja devida a problemas durante a preparação da fase móvel, onde foi feita a solubilização do deslocador.

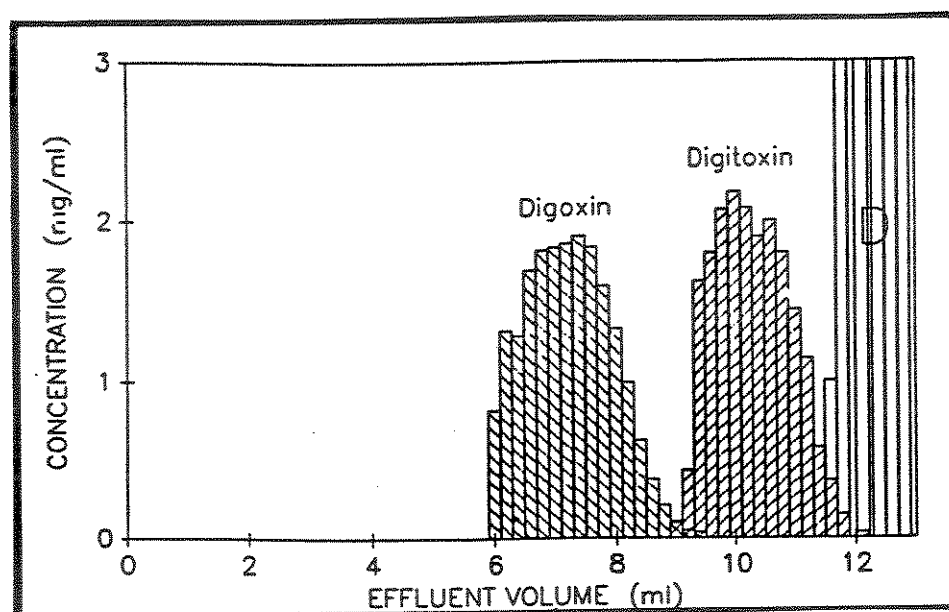


Figura IV.19: Separação de 2,0 ml da mistura digoxina (1,8 mg/ml)/digitoxina (2,0 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 40°C, empregando-se octanol 13,6 mg/ml na fase móvel como deslocador. Demais condições como na figura IV.15

Resumindo-se, pode-se dizer que estes experimentos, juntamente com a medição das isotermas, levaram à conclusão de que a concentração mínima de trabalho para o octanol, como deslocador da digitoxina, situa-se em torno de 25 mg/ml e que, neste sistema de fase móvel e fase estacionária, a digoxina não sofre deslocamento pelo octanol. Portanto, o uso desta fase móvel, além de não permitir a separação do lanatosídeo C e da digoxina, não permite o deslocamento deste último componente pelo octanol. Desta forma, optou-se pela alteração da fase móvel de uma mistura metanol/água 80:20 v/v para 65:35 v/v, visando permitir uma melhor separação do lanatosídeo C e da digoxina e, possivelmente, viabilizar a separação destes por deslocamento ao invés de eluição.

Além da alteração da fase móvel, fez-se necessária a utilização de outro deslocador que pudesse ter atuação sobre a digoxina e o lanatosídeo C. De acordo com o que foi discutido no item IV.2.2, o hexanol foi selecionado como novo deslocador. No entanto, como este composto não teria efeito de deslocador sobre a digitoxina, trabalhou-se apenas com a mistura lanatosídeo C/digoxina.

O primeiro ensaio de cromatografia por deslocamento utilizando hexanol como deslocador é mostrado na figura IV.20. De acordo com os dados obtidos pela medição das isotermas a 65% de metanol (figura IV.9), pode-se prever que a uma concentração de 23,7 mg/ml o hexanol já deveria deslocar a digoxina, apesar de nada poder ser afirmado com relação ao efeito deste sobre o lanatosídeo C. No entanto, o experimento realizado nesta condição mostra tanto o lanatosídeo C quanto a digoxina com um perfil de eluição, sendo que o hexanol só está minimizando a cauda do pico deste último composto. Este problema

pode ser justificado, em parte, pelo fato das isotermas terem sido medidas para cada componente individualmente, sem considerar as interações multi-componente.

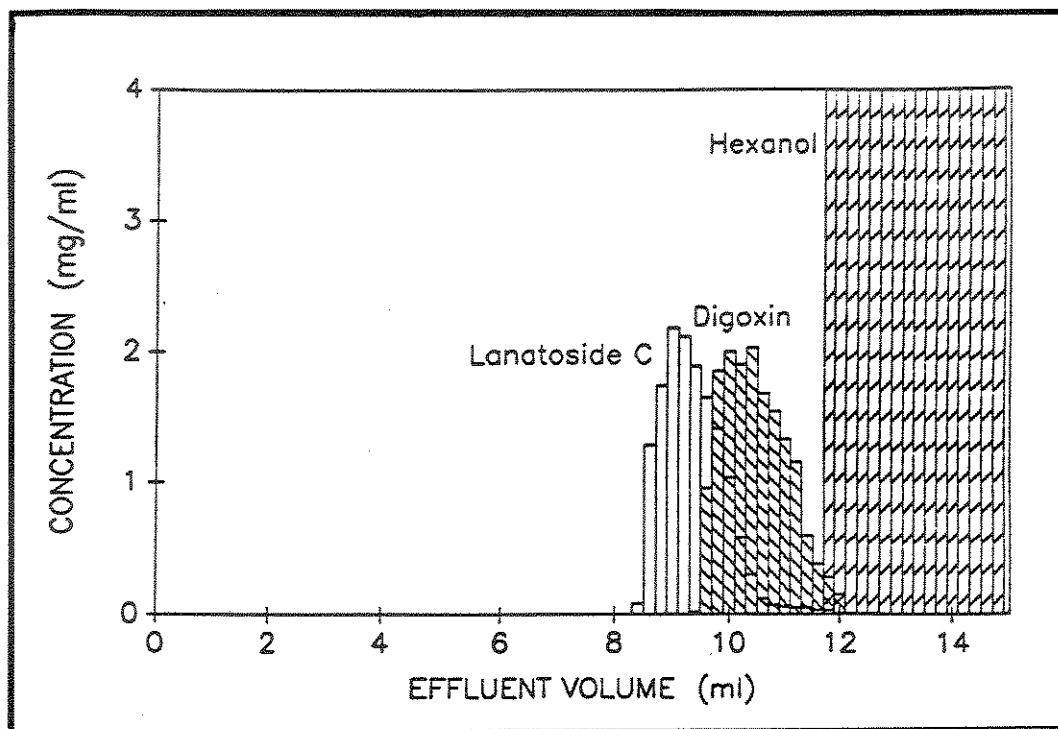


Figura IV.20: Separação de 2,0 ml da mistura lanatosídeo C (1,6 mg/ml)/digoxina (1,7 mg/ml) empregando-se por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se hexanol 23,7 mg/ml, na fase móvel, como deslocador. Fase estacionária: Zorbax ODS (500 x 4,6 mm). Fase móvel: CH₃OH/H₂O (65:35 v/v) 0,2 ml/min.

Um outro ponto que deve ser ressaltado com relação ao experimento representado na figura IV.20 é que, devido à baixa solubilidade do lanatosídeo C e da digoxina na fase móvel empregada, a concentração de ambos na amostra a ser separada é relativamente baixa (cerca de 1,5 mg/ml). Como só foram empregados 2 ml de amostra, a quantidade total de cada composto a ser separada fica bem abaixo da capacidade desta fase estacionária para experimentos de cromatografia por deslocamento.

De acordo com estes resultados, decidiu-se realizar, inicialmente, um experimento de controle, onde o volume de amostra injetado foi aumentado de 2,0 para 4,8 ml. Volumes maiores não foram utilizados devido ao fato deste ser o volume morto do sistema em uso. Este experimento encontra-se representado na figura IV.21 e consiste, basicamente, da eluição sobrecarregada da digoxina e do lanatosídeo C nas mesmas condições utilizadas para os testes de deslocamento anterior.

Conforme pode ser observado na figura IV.21, nas condições empregadas, a eluição sobrecarregada do lanatosídeo C e da digoxina resulta em picos com grande cauda, cuja concentração máxima nas frações coletadas é, praticamente, a mesma utilizada na amostra.

Além disso, em nenhuma das frações obtém-se a digoxina pura e apenas 26,8% do lanatosídeo C é recuperado sem contaminação com a digoxina.

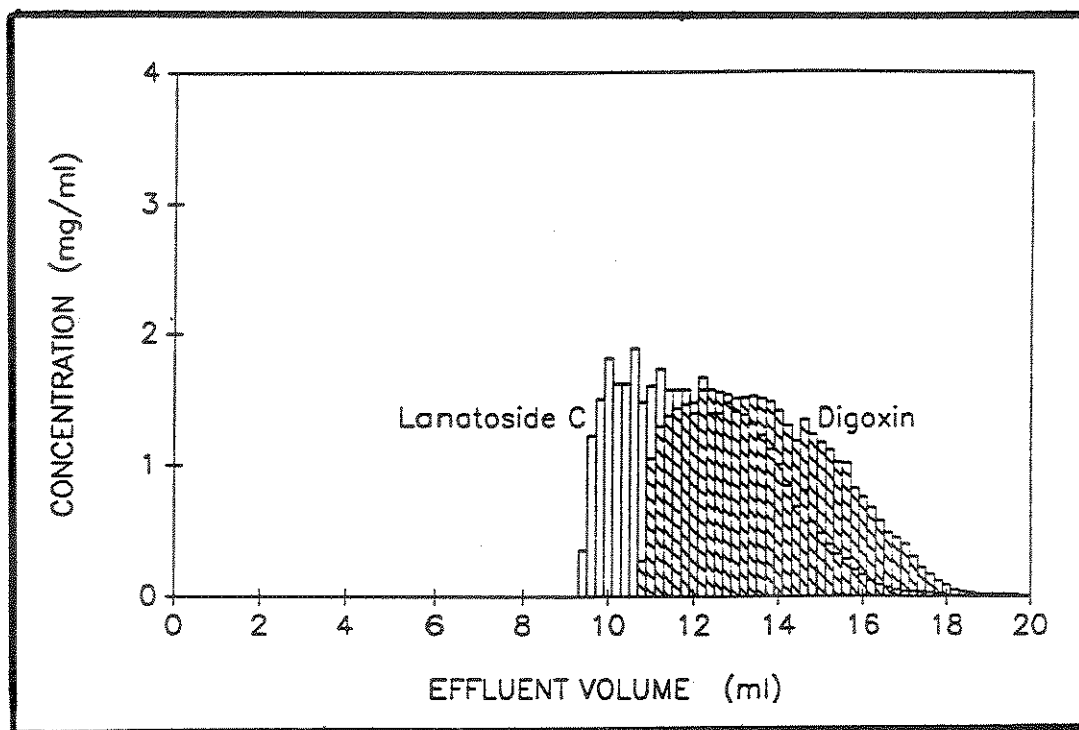


Figura IV.21: Eluição sobrecarregada de 4,8 ml de solução de digoxina 1,5 mg/ml e lanatosídeo C 1,6 mg/ml, na fase móvel. Demais condições como na figura IV.20.

Posteriormente, realizou-se um outro ensaio de cromatografia por deslocamento no qual, além de utilizar-se um maior volume de amostra (4,8 ml) do que o usado no ensaio inicial, empregou-se uma concentração mais elevada de hexanol, objetivando o deslocamento dos dois compostos digitálicos. Este experimento encontra-se representado na figura IV.22.

A comparação da figura IV. 22 com o experimento de controle (figura IV. 21) mostra que, apesar de reduzir drasticamente a cauda tanto do pico da digoxina como do lanatosídeo C, o hexanol não reduz sensivelmente (diferença de 0,4 ml) o valor do volume inicial de coleta de lanatosídeo C no efluente (volume do efluente), enquanto que a diferença no volume do efluente da digoxina é ligeiramente maior (0,6 ml). Pode-se observar também que o perfil da representação gráfica da concentração de digoxina nas frações coletadas é bastante semelhante ao esperado para uma separação por deslocamento. No entanto, nada se pode afirmar quanto à concentração do platô dessa (2,3 mg/ml) com relação ao valor previsto pelas isotermas medidas (figura VI. 9), uma vez que a concentração do hexanol usada no ensaio de deslocamento, assim como a concentração do platô são superiores aos máximos valores medidos para as respectivas isotermas, e as extrapolações devem ser usadas apenas de forma qualitativa. No entanto, como nas duas frações subseqüentes à

região de platô da digoxina tem-se concentrações superiores à do platô, é possível que a condição isostática ainda não tenha sido atingida neste sistema.

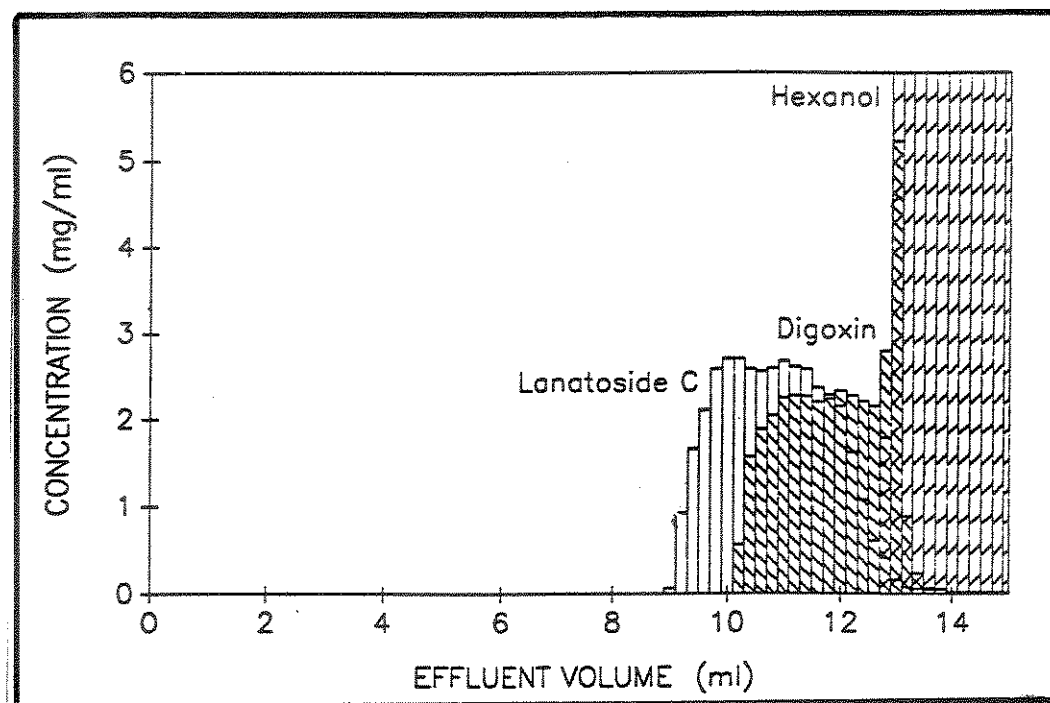


Figura IV.22: Separação de 4,8 ml da mistura lanatosídeo C (1,8 mg/ml)/digoxina (1,6 mg/ml) por cromatografia por deslocamento a 25°C, empregando-se hexanol 32,2 mg/ml, na fase móvel, como deslocador.

Com relação à concentração do platô do lanatosídeo C, também se observa uma ligeira concentração em relação à solução de amostra injetada.

Apesar de várias características indicarem a atuação de um mecanismo de deslocamento na separação, observa-se que apenas 23,8% do lanatosídeo C foi obtido na forma purificada, enquanto nenhuma das frações de digoxina foi obtida sem traços de contaminação com o lanatosídeo C. Desta forma, o deslocamento dos dois componentes, nestas condições, não melhorou a sua separação quando comparada a eluição sobrecarregada.

Conseqüentemente, optou-se pela otimização da separação preparativa do lanatosídeo C e da digoxina por eluição com alteração da composição da fase móvel e o deslocamento da digitoxina pelo octanol em metanol/água 80:20 v/v como forma de concluir o trabalho.

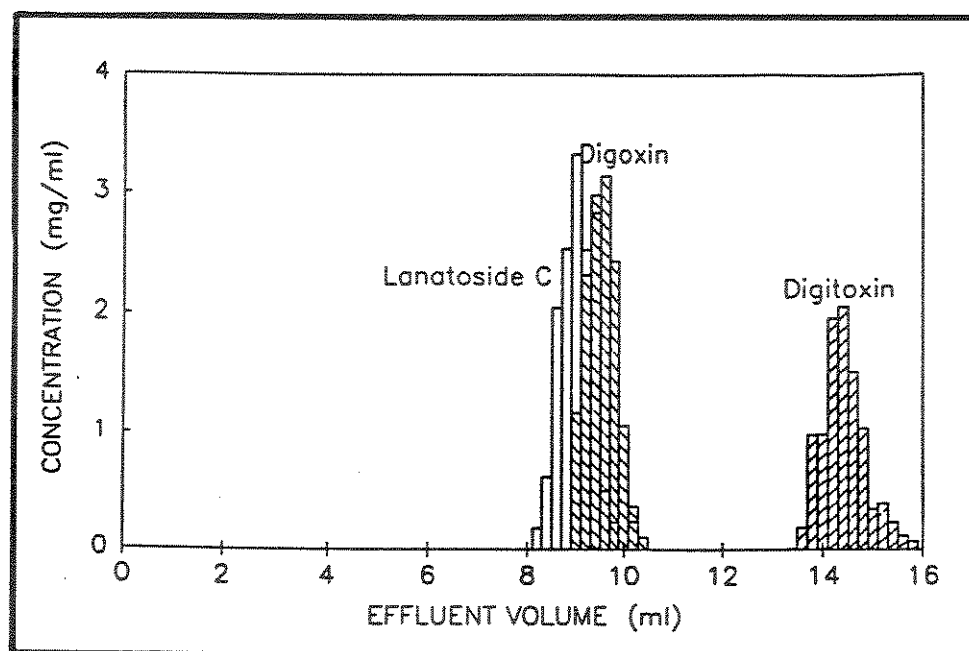


Figura IV.23: Separação de 2,0 ml da mistura lanatosídeo C (1,8 mg/ml)/digoxina (1,5 mg/ml)/digitoxina (1,3 mg/ml) em metanol/água (65:35 v/v) por eluição com metanol/água 80:20 v/v. Demais condições como na figura IV.20.

O primeiro ensaio de controle realizado com alteração de fase móvel encontra-se na figura IV. 23. Neste experimento, utilizou-se a mistura metanol/água 65:35 v/v somente como solvente para a amostra, sendo que a eluição foi feita com a mistura na proporção 80:20 v/v. Como não houve boa separação do lanatosídeo C e da digoxina, optou-se pela alteração da composição da fase móvel, mantendo-se um maior tempo da mistura na proporção 65:35 v/v. O novo ensaio de controle obtido encontra-se na figura IV. 24.

Conforme pode ser observado na figura IV.24, a eluição sobrecarregada da mistura dos 3 compostos digitálicos, nestas condições, levou à obtenção de uma porção significativa de lanatosídeo C na forma pura. No entanto, praticamente não se obteve digoxina purificada. Deve-se notar a grande cauda apresentada pelos picos, a qual é característica deste tipo de separação e é responsável pela dificuldade de isolamento da digoxina. A primeira vista, poderia-se pensar que a separação do lanatosídeo C e da digoxina com esta mistura de solventes poderia ser otimizada, mas, neste caso, esta é a melhor separação obtida com estas soluções, pois a proporção de solventes só foi alterada após o início da eluição da digoxina, o que faz com que a separação destes dois compostos seja isocrática. O uso de uma fase móvel inicial com menor proporção de metanol melhoraria a separação dos dois primeiros compostos, porém, como as solubilidades destes seriam menores, reduziria-se a quantidade de amostra separada em cada experimento.

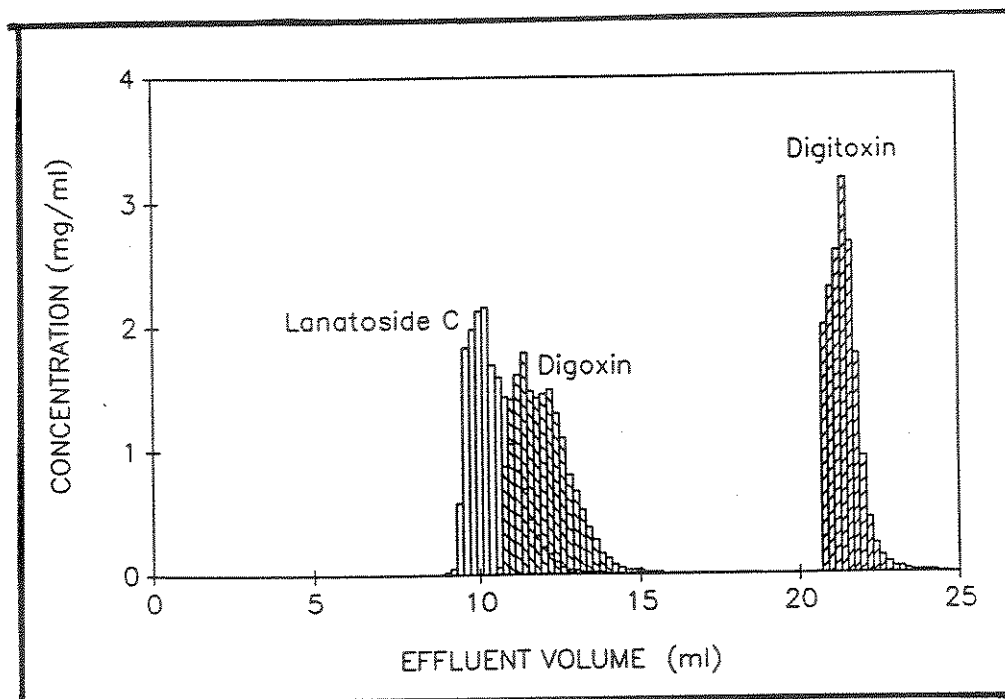


Figura IV.24: Separação de 2,0 ml da mistura lanatosídeo C (1,6 mg/ml)/digoxina (1,5 mg/ml)/digitoxina (1,9 mg/ml) a 25°C em metanol/água (65:35 v/v) por eluição com alteração da fase móvel de metanol/água 65:35 v/v para a proporção 80:20 v/v v/v após 54 min de eluição a 0,2 ml/min. Fase estacionária: Zorbax ODS (500 x 4,6 mm). Detecção: UV 220 nm.

A figura IV. 25 mostra um ensaio de cromatografia por deslocamento nas mesmas condições anteriores. Apesar de os resultados obtidos pela extrapolação das isotermas, medidas com metanol/água na proporção 80:20 v/v, só poder ser utilizado qualitativamente, especialmente pelo fato de estar-se utilizando uma mudança na fase móvel, neste experimento, observa-se o deslocamento da digitoxina pelo octanol e a separação dos outros dois compostos por eluição, conforme o que indicam as isotermas. Tal fato pode ser comprovado pela eluição do lanatosídeo C e da digoxina com o mesmo perfil observado no ensaio de controle (figura IV. 24), enquanto a digitoxina sofreu deslocamento saindo da coluna em um número bastante reduzido de frações mais concentradas, apesar de não se observar alteração significativa no volume de efluente a partir do qual esta começou a ser coletada.

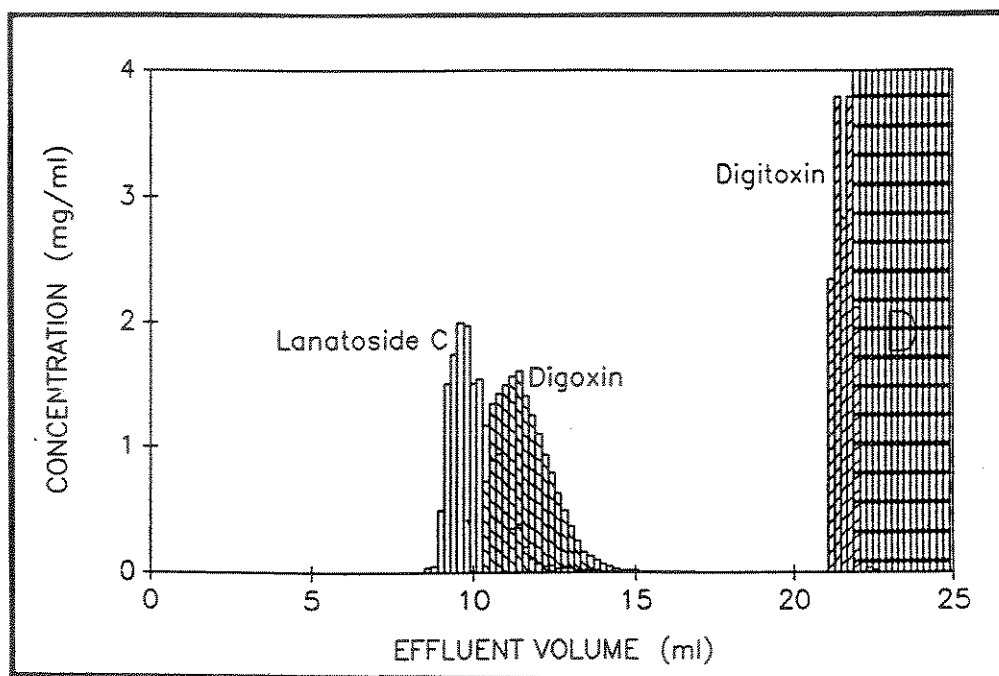


Figura IV.25: Separação de 2,0 ml da mistura lanatosídeo C (1,7 mg/ml)/digoxina (1,8 mg/ml)/digitoxina (1,9 mg/ml) em metanol/água (65:35 v/v) por cromatografia por deslocamento empregando-se uma mistura metanol/água (65:35 v/v) por 54 min, seguida por octanol 24,6 mg/ml em metanol/água 80:20 v/v a 0,2 ml/min. Fase estacionária: Zorbax ODS (500 x 4,6 mm). Detecção: UV 220 nm. Temperatura: 25°C

Realizou-se, então, um último experimento no qual tentou-se maximizar a quantidade de amostra a ser separada, aumentando-se tanto a concentração de cada componente, quanto o volume de amostra injetada. O objetivo deste ensaio era não só otimizar a capacidade da coluna, como também observar as diferenças de comportamento da eluição sobrecarregada e do deslocamento.

Atentando-se para a figura IV. 26, observa-se que a concentração do lanatosídeo C e da digoxina na amostra não puderam ser significativamente alteradas, uma vez que seus limites de solubilidade medidos em metanol/água (65:35 v/v) a 45°C eram de 2,0 mg/ml. Porém, a concentração da digitoxina na amostra a ser separada pôde ser elevada devido ao seu maior limite de solubilidade: 2,8 mg/ml (nas mesmas condições anteriores).

Com relação à separação, observa-se que a separação do lanatosídeo C e da digoxina praticamente não sofreu alteração com relação ao ensaio anterior. A digitoxina, no entanto, começou a ser coletada num volume inicial de efluente bem menor, sendo recolhida num número reduzido de frações muito mais concentradas e não apresentou cauda. Quanto à concentração da digitoxina nas frações coletadas, deve-se observar que ela é bem mais elevada (aproximadamente 8,0 mg/ml) que o limite de solubilidade medido a 45° C (2,8 mg/ml) o que é consequência da atuação do deslocador.

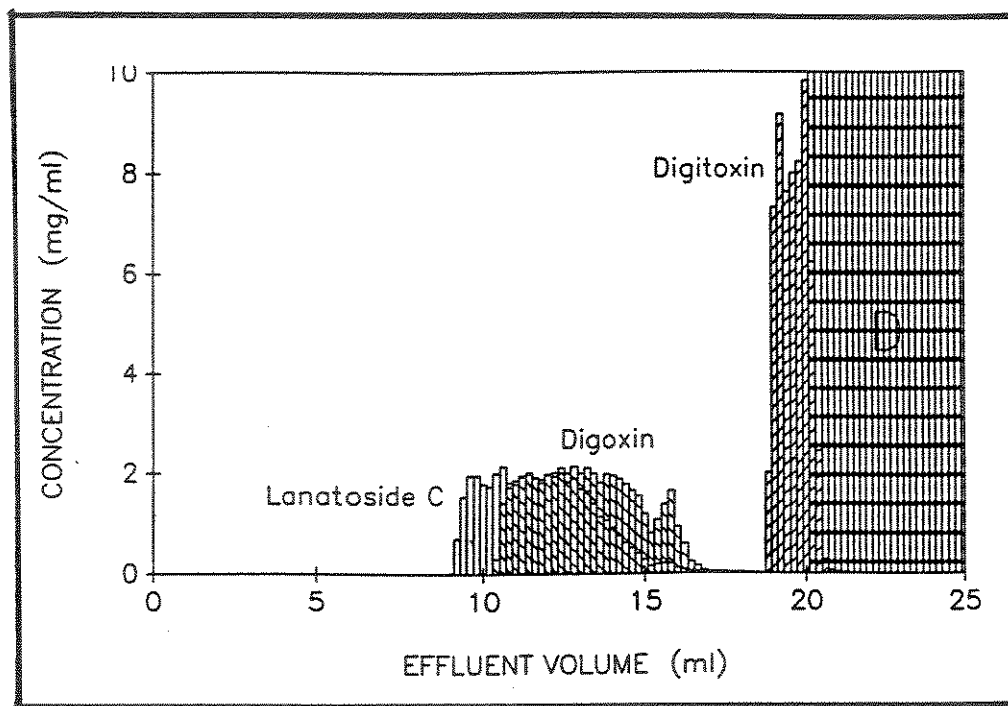


Figura IV.26: Separação de 4 ,8 ml da mistura lanatosideo C (1,8 mg/ml)/digoxina (1,9 mg/ml)/digitoxina (2,6 mg/ml) em metanol/água (65:35 v/v) por cromatografia por deslocamento, empregando-se metanol/água (65:35 v/v) por 54 minutos, seguido de octanol 23,0 mg/ml em metanol/água 80:20 v/v como deslocador. Vazão da fase móvel: 0,2 ml/min. Demais condições como na figura IV.25.

Desta forma, a figura IV. 26 ilustra de forma bastante elucidativa as diferenças nos processos de separação por eluição sobrecarregada e por cromatografia por deslocamento.

PARTE V: CONCLUSÃO

Sumarizando-se os resultados obtidos, pode-se dizer que o emprego de octanol como deslocador da digoxina, digitoxina e lanatosídeo C no sistema Zorbax ODS/metanol-água 80:20 v/v não foi satisfatório, pois este composto só deslocou a digitoxina, sendo que os demais componentes eluíram sem separação adequada. Nota-se ainda que o octanol só funciona como deslocador da digitoxina se sua concentração na fase móvel for maior ou igual a 23,7 mg/ml, conforme dados obtidos pela isoterma e confirmados experimentalmente. Neste mesmo sistema, observou-se que a elevação da temperatura de 25 para 40°C, assim como a elevação da concentração do octanol, reduz o volume de efluente de coleta da digitoxina e o número de frações em que esta é coletada e aumenta a sua concentração em cada fração, de acordo com os princípios da técnica de deslocamento. Verificou-se, ainda, que o aumento do comprimento da coluna de 25 para 50 cm possibilitou o deslocamento da digitoxina pelo octanol, sem a contaminação desta pela digoxina que sofria eluição.

A alteração da fase móvel para metanol/água 65:35 v/v continuou a não permitir o emprego de octanol como deslocador para a digoxina e o lanatosídeo C. O estudo da viabilidade do uso de outros compostos como deslocadores evidenciou a possibilidade do emprego de hexanol como deslocador da digoxina e, possivelmente, do lanatosídeo C, mas não da digitoxina, uma vez que sua isoterma estava abaixo da isoterma deste último composto. Ensaio de cromatografia por deslocamento mostraram que apesar da atuação de um mecanismo de deslocamento na separação do lanatosídeo C e da digoxina, empregando-se hexanol, este não permitiu uma melhor separação que a obtida com eluição sobrecarregada no mesmo sistema.

Desta forma, optou-se pela otimização da separação preparativa do lanatosídeo C e da digoxina por eluição com alteração da composição da fase móvel e o deslocamento da digitoxina pelo octanol em metanol/água 80:20 v/v como forma de concluir o trabalho.

Apesar de não ter sido possível a otimização do processo de separação dos três compostos digitálicos utilizando a técnica de cromatografia por deslocamento, o aprendizado dos métodos de medição de isotermas e o estudo pormenorizado da técnica de cromatografia por deslocamento, juntamente com os ensaios para a

determinação da potencialidade de aplicações de compostos como deslocadores e/ou espaçadores forneceu uma visualização mais objetiva da possibilidade de aplicação deste método em outras separações.

Desta maneira, na primeira parte do trabalho, concretizou-se o aprendizado da técnica de cromatografia por deslocamento, estudando-se o efeito da variação dos diversos parâmetros (temperatura, comprimento da coluna e concentração do deslocador) na eficiência de uma separação. Numa segunda etapa, fez-se um estudo detalhado das etapas e fatores envolvidos na seleção de um deslocador, sendo que a falta de um conhecimento maior nesta área é um dos grandes obstáculos responsáveis pela não utilização da técnica da cromatografia por deslocamento em toda a sua potencialidade.

Avaliando-se o trabalho como um todo, acredita-se que o seu objetivo maior, análise da viabilidade da aplicação da cromatografia por deslocamento na separação de compostos de interesse farmacológico, foi atingida e que as suas vantagens com relação à eluição sobrecarregada deverão continuar sendo exploradas não só na separação de aminoácidos e polipeptídeos. No entanto, o grande responsável pela não obtenção de uma boa separação dos três componentes selecionados por cromatografia por deslocamento foi o fato de não se ter encontrado um sistema cromatográfico ideal para tal separação, mesmo testando-se várias fases estacionárias de diferentes polaridades. Idealmente, utiliza-se um sistema que apresente grande solubilidade dos compostos na fase móvel, com uma maior retenção na coluna, pois nesta situação o emprego da técnica de cromatografia por deslocamento é melhor sucedido.

PARTE VI: BIBLIOGRAFIA

- (1) Hórvath, C.; J. Chromatogr. Lib. 32, 179 (1985)
- (2) Cramer, S.M.; Subramanian, G.; Phillips, M. W.; J.Chromatogr.439, 341 (1988)
- (3) Frenz, J.; Hórvath, C.; High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspective, vol. 5, Academic Press, New York, p. 211 (1988)
- (4) Antia, F.D.; Hórvath, C.; HPLC of Peptides and Proteins: Separations, Analysis and Conformation, CRC Press, Boca Raton, p. 809 (1990)
- (5) Hórvath, C.; Kalász, H.; J. Chromatogr. 239, 423 (1982)
- (6) Verzele, M.; Dewaele, C.; Van Dijck, G.; Van Haver, D.; J. Chromatogr. 249, 231 (1982)
- (7) Dhar, M.M.; Mal Khanna, N.; Lal Dhar, M.; Índia-Patente nº 62497, Appl 07/12/57 - Chemical Abstracts 53:652i
- (8) Langlume, N.; França-Patente nº 2552767, Appl 27/09/83 - Chemical Abstracts 104:230439
- (9) Fóss, P.R.B.; Benezra, S.A.; Analytical Profiles of Drug Substances 9, 207 (1980)
- (10) Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 4-edição, Editora da UNICAMP, Campinas (1990)
- (11) Basso, M.A.; Tese de Doutorado: "Análise da radiação gama como agente de imobilização de algumas fases estacionárias sobre suportes para uso em cromatografia gasosa", UNICAMP (1989)
- (12) Wehrli, A. em Practice of High Performance Liquid Chromatography, H. Engelhardt, p. 110 (1985)
- (13) Ganetsos, G.; Barker, P.E.; J. Chem. Technol. Biotechnol. 50, 101 (1991)
- (14) Colin, H.; Lowy, G.; Cazes, J.; Am. Lab. 136 (May 1985)
- (15) Dwyer, J.L.; Biotechnology, 957 (Nov. 1984)
- (16) Cox, G.B.; Snyder, L.R.; LC-GC 6, 894 (1988)
- (17) Gareil, P.; Rosset, R.; J. Chromatogr. 450, 13 (1988)
- (18) Destefano, J.J.; Kirkland, J.J.; Anal. Chem. 47, 1103 (1975)
- (19) Hupe, K.P.; Laver, H.H.; J. Chromatogr. 203, 41 (1981)
- (20) Coq, B.; Cretier, G.; Gonnet, C.; Rocca, J.L.; Chromatographia 12, 139 (1979)

- (21) Mazsaroff, I.; Regneir, F.E.; *J. Liq. Chromatogr.* 9, 2563 (1986)
- (22) Kaminski, M.; Reusch, J.F.; *J. Chromatogr.* 436, 367 (1980)
- (23) Verzele, M.; Geeraert, E.; *J. Chromatogr. Sci.* 18, 559 (1980)
- (24) Claesson, S.; *Rec. Trav. Chim.* 65, 571 (1946)
- (25) Phillips, C.S.G.; *Disc. Faraday Soc.* 7, 241 (1949)
- (26) Spedding, F.H.; Powell, J.E.; Fulmer, E.I.; Butler, T.A.; *J. Am. Chem. Soc.* 72, 2354 (1950)
- (27) Shepard, C. C.; Tiselins, A.; *Disc. Faraday Soc.* 7, 275 (1949)
- (28) Tiselius, A.; Li, C.H.; Paderson, K.O.; Hagdahl, L.; Carstensen; *J. Biol. Chem.* 190, 317 (1951)
- (29) Hagdahl, L.; Williams, R.J.P.; Tiselius, A.; *Arkiv Kemi* 4, 193 (1952)
- (30) Porath, J.; *Acta Chem. Scand.* 6, 1237 (1952)
- (31) Porath, J.; *Acta Chem. Scand.* 8, 1813 (1954)
- (32) Patridge, S. M.; *Disc. Faraday Soc.* 7, 296 (1949)
- (33) Patridge, S.M.; Brimley, R.C.; *Biochem. J.* 48, 313 (1951)
- (34) Patridge, S.M.; Brimley, R.C.; *Biochem. J.* 49, 153 (1951)
- (35) Helfferich, F.; *Ind. Eng. Chem. Fund.* 6, 362 (1967)
- (36) Helfferich, F.; Klein, G.; *Multicomponent Chromatography-Theory of Interference*, Marcel Dekker, New York (1970)
- (37) Helfferich, F.; James, O.B.; *J. Chromatogr.* 46, 1 (1970)
- (38) Hórvath, C.; Nahum, A.; Frenz, J.H.; *J. Chromatogr.* 218, 365 (1981)
- (39) Hórvath, C.; Frenz, J.H.; El Rassi, Z.; *J. Chromatogr.* 255, 273 (1983)
- (40) Hórvath, C.; Schriek, V.D.; Frenz, J.; *J. Chromatogr.* 330, 1 (1985)
- (41) Hórvath, C.; Cramer, S.M.; *Prep. Chromatogr.* 1, 29 (1988)
- (42) Cramer, S.M.; Phillips, M.W.; Subramanian, G.; *J. Chromatogr.* 454, 1 (1988)
- (43) Katti, A.M.; Dose, E.V.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr.* 540, 1 (1991)

- (44) Hórvath, C.; Frenz, J.; Am. Inst. Chem. Eng. J. 31, 400 (1985)
- (45) Guiochon, G.; Golshan-Shirazi, S.; Anal. Chem. 61, 1960 (1989)
- (46) Valkó, K.; Slégel, P.; Bati, J.; J. Chromatogr. 386, 345 (1987)
- (47) DeVault, D.; J. Am. Chem. Soc. 65, 532 (1943)
- (48) Thomas, H.; Ann. N. Y. Acad. Sci. 49, 161 (1948)
- (49) Cretier, G.; Racca, J.L.; Chromatographia 21, 143 (1986)
- (50) Viscomi, G.C.; Ziggioni, A.; Verdini, A.S.; J. Chromatogr. 482, 99 (1989)
- (51) Kalász, H.; Hórvath, C.; J. Chromatogr. 215, 295 (1981)
- (52) Cramer, S.M.; Subramanian, G.; Sep. Purif. Methods 19, 31 (1990)
- (53) Viscomi, G.C.; Cardinali, C.; Longobardi, M.G.; Verdini, A.S.; J. Chromatogr. 549, 175 (1991)
- (54) Jacobson, J.; Frenz, J.; Hórvath, C.; J. Chromatogr. 316, 53 (1984)
- (55) Huang, J.X.; Hórvath, C.; J. Chromatogr. 406, 278 (1987)
- (56) Chen, T.W.; Pinto, N.G.; Broclin, L.V.; " A rapid method for determining multicomponent isotherms for displacement chromatography" - cópia do artigo original antes de sua publicação.
- (57) Jacobson, J.M.; Frenz, J.H.; Hórvath, C.; Ind. Eng. Chem. Res. 26, 43 (1987)
- (58) Golshan-Shirazi, S.; Guiochon, G.; Anal. Chem. 60, 2364 (1988)
- (59) Huang, J. X.; Guiochon, G.; J. Colloid Interface Sci. 128, 577 (1989)
- (60) Broughton, D.C.; Ind. Eng. Chem. 40, 1506 (1948)
- (61) Snyder, L.R.; Poppe, H.; J. Chromatogr. 184, 363 (1980)
- (62) Le Van, M.D.; Vermeulen, T.; J. Phys. Chem. 85, 3247 (1981)
- (63) Freundlich, H.; Colloid and Capillary Chemistry, Methuen and Co., London (1926)
- (64) Jönsson, J.A.; Lovkvist, P.; Chemomet. Intell. Lab. Syst. 5, 303 (1989)
- (65) Jacobson, J.M.; Frenz, J.; Hórvath, C.; Ind. Eng. Chem. Res. 26, 43 (1987)
- (66) Cremer, E.; Huber, J.F.K.; Angew. Chem. 73, 461 (1961)

- (67) Reilly, C.N.; Hildebrand, G.P.; Ashley, J.W.; *Anal. Chem.* 34, 1198 (1962)
- (68) Jacobson, J.M. Frenz, J.; *J. Chromatogr.* 499, 5 (1990)
- (69) Stoll; *The Cardiac Glycosides*, London, 727 (1937)
- (70) Morton, J.F.; *Major Medicinal Plants*, Charles C. Thomas, Illinois (1977)
- (71) *The Merck Index*, 11th ed.; Merck & Co., Inc., Rahway (1989)
- (72) Cobb, P.H.; *Analyst* 101, 768 (1976)
- (73) Jakovljevic, I.M.; *Analytical Profiles of Drug Substances* 3, 149 (1974)
- (74) Danieli, N.; Mazur, Y.; Sondheimer, F.; *Tetrahedron* 22, 3189 (1966)
- (75) Zaffaroni, A.; Burton, R.B.; Keutmann, H.E.; *J. Biol. Chem.* 177, 109 (1949)
- (76) Reichstein, T.; Schindler, O.; *Helv. Chim. Acta* 34, 108 (1951)
- (77) Jensen, K.B.; *Acta Pharmac. Tox.* 12, 27 (1956)
- (78) Tantivanata, P.; Wright, S.E.; *J. Pharm. Pharmacol.* 10, 189 (1958)
- (79) Pötter, H.; *Pharmazie* 18, 554 (1963)
- (80) Wolf, L.; Karacsony, E.M.; *Planta Med.* 11, 432 (1963)
- (81) Stahl, E.; Kaltenbach, U.; *J. Chromatogr.* 5, 458 (1961)
- (82) Heusser, D.; *Dtsch. Apoth. -Ztg.* 103, 1101 (1965)
- (83) Hauser, W.; Kartning, T.; Verdino, G.; *Scientia Pharm.* 36, 237 (1968)
- (84) Pötter, H.; Baerisch, H.; *Pharmazie* 27, 315 (1972)
- (85) Evans, F.J.; Flemans, P.A.; Duignan, C.F.; Cowley, P.S.; *J. Chromatogr.* 88, 341 (1974)
- (86) Stoll, A.; Angliker, E.; Barfuss, F.; Kussmaul, W.; Renz, J.; *Helv. Chim. Acta* 34, 1460 (1951)
- (87) Kaiser, F.; *Arch. Pharm. Berlin* 299, 263 (1966)
- (88) Hauser, W.; Kartnig, T.; Verdino, G.; *Scientia Pharm.* 37, 149 (1969)
- (89) Jelliffe, R.W.; Blankenhorn, D.H.; *J. Chromatogr.* 12, 268 (1963)

- (90) Wilson, W.E.; Johnson, S.A.; Perkins, W.H.; Ripley, J.E., *Anal. Chem.* 39, 40 (1967)
- (91) Evans, F.J.; *J. Chromatogr.* 88, 411 (1974)
- (92) Lindner, W.; Frei, R.W.; *J. Chromatogr.* 117, 81 (1976)
- (93) Nachtmann, F.; Spitzzy, H.; Frei, R. W.; *J. Chromatogr.* 122, 293 (1976)
- (94) Lötscher, K.M.; Brander, B.; Kern, H.; Varian Aerograph Application Notes n^o 8 (1975)
- (95) Castle, M.C.; *J. Chromatogr.* 115, 437 (1975)
- (96) Chromatography, Alltech, Catálogo n^o 200, p. 388 e 418
- (97) Erni, F.; Frei, R.W.; *J. Chromatogr.* 130, 169 (1977)
- (98) Nachtmann, F.; Spitzzy, H.; Frei, R.W.; *Anal. Chem.* 48, 1576 (1976)
- (99) Sener, B.; Evren, N.; Ozguven, M.; Bingol, F.; Mutlugil, A.; *J. Pharm. Belg.* 42, 188 (1987) - Chemical Abstract 107:205268t
- (100) Henry, R.A.; Schmit, J.A.; Dieckman, J.F.; *J. Chromatogr. Sci.* 9, 513 (1971)
- (101) The United States Pharmacopeia, XXI Revision, United States Pharmacopeia Convention, Inc.; Rockville, 1985
- (102) Ovadi, J.; Orosz, F.; Nuridsany, Z.; Gall, J.; Hungria-Patente n^o 42782, Appl. 02/08/84 - Chemical Abstracts 109:27679i
- (103) Veshchikov, V.V.; Garbuzora, V.M.; Shilov, Yu. M.; Grinkevich, N. I.; Sorokina, A. A.; *Khim. Farm. Zh.* 18, 236 (1984) - Chemical Abstracts 100:161845
- (104) Hiermann, A.; Kartinig, T.; Alemanha-Patente n^o 2633490, Appl. 26/07/76 - Chemical Abstracts 88:263490
- (105) Kaminski, M.; Sledzinska, B.; Klawiter, J.; *J. Chromatogr.* 367, 45 (1986)
- (106) Kroszczynski, W.; Lukaszewski, M.; Zurkowska, J.; Ozarowski, A.; *Acta Polon. Pharm.* 21, 271 (1964)
- (107) Gisvold, O.; *J. Pharm. Sci.* 61, 1320 (1972)
- (108) Kowalewski, W.; Skrzypczak, L.; Wojtaszek, M.E.; Jerzy, L.; Polônia-Patente n^o 97158, Appl. 21/05/75
- (109) Zyner, M.; Kurek, Z.; Wraga, M.S.; Polônia-Patente n^o 78425, Appl. 21/09/72 - Chemical Abstracts 90:76556

- (110) Ligeti, V. G.; Pharmazie 14, 162 (1959)
- (111) Windaus, F.; Ber. 58, 2503 (1925)
- (112) Madaus e Colaboradores; França-Patente nº 1508234, Appl. 21/11/66 - Chemical Abstracts 70:31684
- (113) Makarevich, I.F.; Kislechenko, S.G.; Kolesnikov, D.G.; Klimenko, O.I.; Khim. Farm. Zh. 6, 31 (1972)
- (114) Kühne, W.; Weiske, E.; Kohlmay, K.H.; Alemanha-Patente nº 134644, Appl. 06/10/77 - Chemical Abstracts 91:96620
- (115) Sledzinska, B.; J. Chromatogr. 303, 179 (1984)
- (116) Braithwaite, A.; Smith, F.J.; Chromatographic Methods, Chapman and Hall Ltd, London, 4^a ed., 1985
- (117) Hörvath, C.; Antia, F.D.; J. Chromatogr. 556, 119 (1991)