

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE: EVOLUÇÃO E APLICAÇÕES

Sabrina Laíz Büttendörfer

Porto Alegre, novembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE: EVOLUÇÃO E APLICAÇÕES

Sabrina Laíz Büttendender

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Maria Volpato

Orientadora

Elisa de Saldanha Simon

Coorientadora

Porto Alegre, novembro de 2016.

## RESUMO

Esta revisão aborda a Cromatografia Contracorrente (CCC), uma técnica de separação que utiliza duas fases líquidas imiscíveis em uma tubulação submetida a movimento giratório em torno de seu próprio eixo e em torno do eixo central do equipamento. As vantagens da CCC frente a outras técnicas cromatográficas estão relacionadas principalmente à ausência de um suporte sólido. São apresentados os principais aspectos em relação à evolução da técnica, ao desenvolvimento metodológico e às aplicações a produtos vegetais e enantioseparação relatadas em estudos publicados nos últimos anos. O sistema solvente bifásico (SSB) é um ponto crítico do método, e a sua seleção tem sido alvo de importantes estudos, os quais incluem também o desenvolvimento de modelos completamente teóricos para escolha do SSB ideal. As tendências observadas em relação aos SSBs empregados apontam para o uso de alcanos, já tradicionais em CCC, em que podem ser adicionados agentes modificadores. Para o isolamento de compostos bioativos, destaca-se a utilização de sistemas bifásicos aquosos com adição de polímeros ou líquidos iônicos. Algumas modificações dos modos de eluição são relatados: gradientes, extrusão, modo duplo, reciclagem e zona de refinamento de pH. A detecção contínua por ultravioleta é utilizada na grande maioria das aplicações. O emprego da CCC para a separação de produtos naturais, enantiômeros e outras aplicações é destacado, evidenciando o potencial desta técnica na separação de compostos com atividade biológica.

**Palavras-chave:** cromatografia contracorrente, sistema solvente, produtos naturais, enantioseparação.

## ABSTRACT

This review covers the Countercurrent Chromatography (CCC), a separation technique that uses two immiscible liquid phases in a coiled tube subjected to a rotating movement around its own axis and around the central axis of the equipment. The advantages of CCC over other chromatographic techniques are mainly associated with the absence of a solid support. The main aspects regarding the evolution of the technique, the method development and the applications to vegetal products and enantioseparation reported in studies published in recent years are presented. The biphasic solvent system (BSS) is a critical point of the method, and its selection has been the subject of important studies, including the development of completely theoretical models to choose the ideal BSS. Trends observed concerning the employed BSSs address to the use of alkanes, well established in CCC, in which modifying agents can be added. For the isolation of bioactive compounds, the use of aqueous biphasic systems with addition of polymers or ionic liquids stands out. Some modifications of the elution modes are reported: gradient, extrusion, dual mode, recycling and pH-zone refining. Continuous ultraviolet detection is used in most applications. The use of CCC for the separation of natural products, enantiomers and other applications is highlighted, pointing the potential of this technique for the separation of biologically active compounds.

**Keywords:** countercurrent chromatography, solvent system, natural products, enantioseparation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Movimento planetário da coluna espiral tipo J. ....	11
Figura 2 – Movimento hidrodinâmico das duas fases líquidas de um instrumento tipo J.....	12
Figura 3 – Artigos publicados com estudos em HSCCC e HPCCC.....	16
Figura 4 – Composição percentual (v/v/v/v) das 23 misturas nomeadas de A a Z .....	17
Figura 5 – Faixa ideal dos valores de <i>K</i> . ....	22
Figura 6 – Perfil de separação de podofilotoxinas (1, 2, 3 e 4) com SSB HEMWat .....	26
Figura 7 – Perfil de separação de oligostibenos (1, 2, 3, 4 e 5) com SSB HEMWat .....	27
Figura 8 – Separação de compostos naturais (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) de <i>N. chinensis</i> .....	28
Figura 9 – Esquema de operação do modo duplo múltiplo. ....	29
Figura 10 – Perfis de separação dos pares de enantiômeros 2 e 3.....	30
Figura 11 – Cromatogramas do extrato vegetal e suas frações .....	31
Figura 12 – Mecanismo da CCC com refinamento por zona de pH .....	32
Figura 13 – Publicações de acordo com a área de aplicação dos compostos separados .....	35
Figura 14 – Classes dos compostos naturais separados por CCC .....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições cromatográficas e resultados obtidos na comparação entre instrumentos de HSCCC e HPCCC operando a diferentes velocidades .....	15
Tabela 2 – Volumes de solventes (em mL) para testes de partição.....	23
Tabela 3 – Perfil quantitativo de compostos naturais purificados de acordo com sua classe e o tipo de SSB empregado .....	37
Tabela 4 – Comparação entre a enantioseparação em escala preparativa de ácido 2-fenilpropiônico por CLAE e HSCCC .....	39
Tabela 5 – Principais estudos de enantioseparação publicados entre 2013 e 2016. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD	Ciclodextrina
ChMWat	<i>Chloroform/Methanol/Water</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSMO-RS	<i>Conductor-like Screening Model for Real Solvents</i>
CPC	Cromatografia de Partição Centrífuga
DESIGNER	<i>Depletion and Enrichment of Select Ingredients Generating Normalized Extract Resources</i>
ELS	<i>Evaporative Light Scattering</i>
EM	Espectroscopia de Massas
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
G.U.E.S.S.	<i>Generally Useful Estimate for Solvent Systems</i>
HBuWat	<i>Hexane/Butanol/Water</i>
HEMWat	<i>Hexane/Ethyl acetate/Methanol/Water</i>
HPCCC	<i>High-Performance Countercurrent Chromatography</i>
HSCCC	<i>High-Speed Countercurrent Chromatography</i>
<i>K</i>	Coefficiente de Partição
LI	Líquido Iônico
NH <sub>3</sub>	Amônia
NRTL-SAC	<i>Nonrandom Two-Liquid Segment Activity Coefficient</i>
PEG	Polietilenoglicol
R <sub>f</sub>	Fator de Retenção
RMN-H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
SQ	Seletor Quiral
SSB	Sistema Solvente Bifásico
TFA	Ácido Trifluoracético
UNIFAC	<i>Universal Quasichemical Functional-group Activity Coefficients</i>
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>10</b>
<b>3 PRINCÍPIO FUNDAMENTAL .....</b>	<b>11</b>
<b>4 EVOLUÇÃO DA CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE.....</b>	<b>13</b>
<b>5 SISTEMAS SOLVENTES.....</b>	<b>16</b>
5.1 SISTEMAS SOLVENTES TRADICIONAIS .....	16
5.2 SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS .....	18
5.3 OUTROS SISTEMAS SOLVENTES.....	19
5.4 SELEÇÃO DO SSB .....	20
5.4.1 SELEÇÃO EMPÍRICA.....	21
5.4.2 SELEÇÃO SEMIEMPÍRICA .....	23
5.4.3 SELEÇÃO TEÓRICA.....	24
<b>6 MODOS DE ELUIÇÃO.....</b>	<b>24</b>
6.1 ELUIÇÃO GRADIENTE.....	25
6.2 ELUIÇÃO COM EXTRUSÃO .....	27
6.3 ELUIÇÃO EM MODO DUPLO .....	28
6.4 RECICLAGEM .....	30
6.5 REFINAMENTO POR ZONA DE PH .....	31
<b>7 SISTEMAS DE DETECÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>8 APLICAÇÕES DA CCC.....</b>	<b>34</b>
8.1 SEPARAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	35
8.2 ENANTIOSSEPARAÇÃO .....	38
8.3 OUTRAS APLICAÇÕES .....	42
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>43</b>
<b>10 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cromatografia contracorrente é uma técnica de separação por meio do particionamento da amostra em um sistema líquido-líquido, sem envolver uma fase sólida. A fase estacionária e a fase móvel são líquidos imiscíveis, obtidas a partir de uma mistura de solventes pré-equilibrados. A proporção relativa dos solutos da amostra em cada uma das fases está relacionada aos respectivos coeficientes de partição (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Os estudos iniciais em separação contracorrente foram realizados por Yoichiro Ito, nos Estados Unidos, na década de 60, a partir dos quais os experimentos se dividiram em duas metodologias distintas. A que hoje é chamada de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC), envolve o uso de cartuchos interconectados em torno de um eixo onde há o movimento de rotação. Nesse mecanismo, o movimento centrífugo resultante no equipamento produz um campo gravitacional constante, mantendo a fase estacionária nos cartuchos, enquanto a fase móvel passa por eles através de canais (YOON; CHIN; KIM, 2010).

Já a outra técnica, chamada de cromatografia contracorrente (CCC), utiliza, principalmente, uma tubulação de politetrafluoretileno enrolada em um suporte cilíndrico, que é submetido a um movimento giratório em dois eixos: em torno do seu próprio eixo e em torno do eixo central do equipamento. Essa combinação resulta em um movimento planetário, que produz campo gravitacional variável dentro dos tubos (também chamados de coluna), o que permite alta eficiência de separação (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Nas duas técnicas há o movimento contracorrente entre as fases. Devido à diferença de densidade entre os solventes e ao campo gravitacional originado do movimento centrífugo ou planetário, a tendência é que a fase estacionária se movimente em direção oposta em relação ao fluxo de fase móvel (ITO, 2014). O enfoque desse trabalho será o desenvolvimento e as aplicações de separações de misturas realizadas por CCC, visto que é a técnica de separação contracorrente mais utilizada e com aplicações mais promissoras, principalmente na área de produtos naturais (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2009).

Em comparação a outras técnicas cromatográficas, as principais vantagens da CCC estão relacionadas à ausência de suporte sólido para fase estacionária, permitindo a recuperação total da amostra injetada, visto que não há adsorção de analitos, processo irreversível que pode levar ao esgotamento do suporte e à perda de amostra (ITO, 2005a). Ainda, o consumo de solvente por carga de amostra processada é menor em CCC, quando comparado com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), principalmente devido à

natureza líquida da fase estacionária. A razão entre o volume de fase estacionária disponível para separação e o volume de fase móvel é em torno de 80% na coluna de CCC, em contraste a 20% da CLAE (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006; MINGUILLÓN, 2012), onde a fração da coluna que participa ativamente do processo de separação é limitada pela interface com a fase móvel.

Além disso, em CLAE, a variação de fase estacionária depende da disponibilidade de colunas, que em geral representam um custo elevado no desenvolvimento metodológico. Em CCC, dispondo apenas de alguns solventes de uso comum, pode-se ter grande variedade de fase móvel e de fase estacionária, apenas variando as proporções de cada solvente no sistema (HUANG; DI, 2015).

Em processos cromatográficos com suporte sólido, como CLAE e Cromatografia Gasosa, a eficiência da separação é indicada pelo número de pratos teóricos, que podem chegar a centenas de milhares. Esse parâmetro não deve ser utilizado para comparação com técnicas de fase estacionária líquida, cujos pratos teóricos alcançados variam de centenas a alguns milhares (ITO, 2005a). Em CCC, a retenção da fase estacionária está relacionada à eficiência do processo. A variação no volume relativo de fase estacionária na coluna é capaz de modificar a resolução entre compostos com diferentes coeficientes de partição, melhorando a eficiência de uma separação específica em análise de mesmas condições (SUTHERLAND, 2007).

Apesar das vantagens relacionadas ao uso de fase estacionária líquida e do crescente número de estudos relacionados à separação de compostos naturais, enantiômeros, macromoléculas e impurezas, ainda há pouca aplicação da CCC na indústria farmoquímica e farmacêutica. Sumner (2011) lista como principais barreiras: o processo de escolha do sistema solvente; os maiores tempos de corrida, especialmente quando comparados aos de CLAE de fase reversa; e a construção de equipamentos de qualidade, entre outros. Ainda assim é uma técnica com uso industrial promissor, pois o escalonamento de um método analítico piloto pode ser feito de forma rápida e previsível, com elevadas taxas de pureza e rendimento (SUTHERLAND, 2007; WOOD et al., 2007), sendo este fato um diferencial em comparação com outras técnicas cromatográficas.

Este trabalho tem como objetivo revisar a evolução da técnica de cromatografia contracorrente, abordando aspectos relacionados aos sistemas solventes e modos de eluição, enfatizando os estudos de purificação de produtos naturais, enantioseparação e outras aplicações publicadas recentemente.

## 2 METODOLOGIA

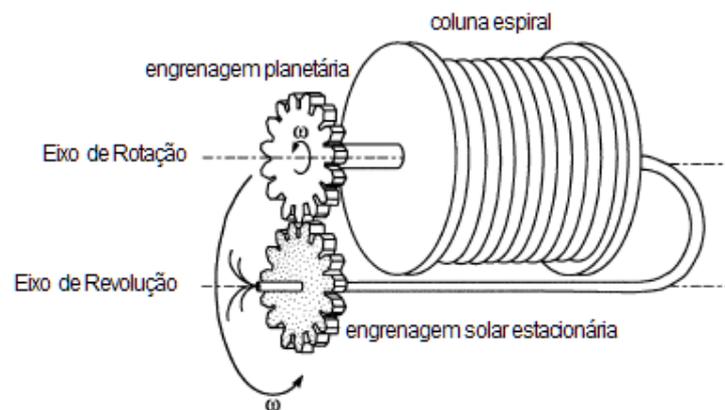
Para o desenvolvimento desta revisão, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados Scopus e Web of Science, utilizando os termos de busca “countercurrent chromatography” e “counter-current chromatography”. Artigos científicos e artigos de revisão foram selecionados e utilizados na elaboração deste trabalho.

Para a construção de indicadores relacionados às publicações na área, utilizou-se a base de dados Scopus, onde foi pesquisada a palavra-chave “countercurrent chromatography”, limitando apenas para resultados em inglês, publicados entre janeiro de 2013 e agosto de 2016. Cada trabalho encontrado relacionado a uma aplicação prática foi listado em uma planilha de Excel<sup>®</sup>, junto com as seguintes informações: fonte de publicação, tipo de equipamento utilizado, escala de trabalho e área de aplicação. A partir deste levantamento, os dados compilados foram analisados e geraram os gráficos apresentados no trabalho. Trabalhos cujo enfoque principal era aprimoramento instrumental e modelagem matemática em CCC não foram exaustivamente analisados, e foram segregados à parte.

### 3 PRINCÍPIO FUNDAMENTAL

A CCC é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, em que o princípio de separação é baseado na partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, uma sendo mantida estacionária em um sistema tubular giratório e outra móvel, sendo bombeada pelo sistema. Diferente de uma cromatografia líquida em coluna, onde a fase estacionária líquida está adsorvida em um suporte sólido, em CCC não há suporte. A fase estacionária é mantida no interior da coluna devido ao campo gravitacional gerado no equipamento. Em equipamentos hidrostáticos, o campo gravitacional é derivado da força centrífuga. Nos equipamentos hidrodinâmicos, o campo gravitacional gerado na coluna tubular espiralada é variável, devido à força gravitacional resultante da combinação dos movimentos síncronos de rotação e translação. A Figura 1 ilustra um instrumento que realiza esse movimento planetário, conhecido como “tipo J síncrono”, em que os eixos de rotação e revolução são paralelos. A estrutura na qual a coluna está enrolada gira em torno do seu próprio eixo e em torno do eixo central do equipamento na mesma velocidade angular ( $\omega$ ) e na mesma direção (ITO, 2005a).

Figura 1 – Movimento planetário da coluna espiral tipo J



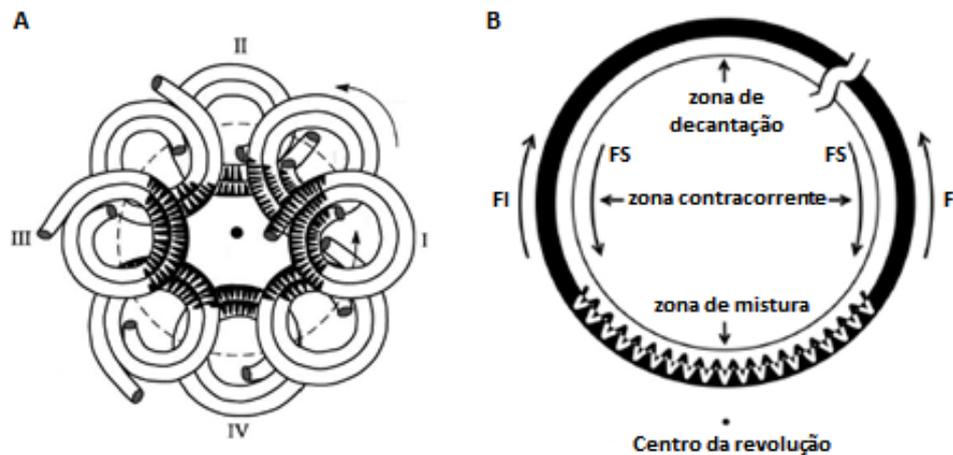
Fonte: adaptado de Ito (2005a).

Esse movimento mantém a fase menos densa do sistema em uma das extremidades da coluna, chamada de cabeça, enquanto a fase mais densa tende a se movimentar em direção à outra extremidade, chamada de cauda. Essa tendência hidrodinâmica permite a operação do equipamento em dois modos. No modo normal, a coluna é inicialmente preenchida pela fase mais densa (a fase inferior do sistema solvente), e então a fase móvel de menor densidade (a fase superior) é bombeada da cauda para a cabeça da coluna. Já no modo reverso, a coluna é preenchida com a fase menos densa e a fase mais densa é bombeada da cabeça para a cauda.

Dessa forma, com velocidade de rotação e fluxo adequados, é possível reter mais de 50% de fase estacionária na coluna, que é o percentual mínimo indicado para separações eficientes (ITO, 1981; MINGUILLÓN, 2012).

Ainda, esse comportamento hidrodinâmico proporciona um eficiente contato do soluto com as duas fases líquidas. Na Figura 2A é possível observar um esquema com várias posições (I, II, III e IV) que a coluna atinge durante o movimento planetário. A área da coluna é dividida em zonas diferentes, devido aos diferentes campos gravitacionais resultantes (Figura 2B). Próximo ao eixo central de rotação está a zona onde ocorre a mistura das duas fases líquidas, de campo gravitacional nulo, e na área restante tem-se a zona de decantação, onde o campo é alto (MINGUILLÓN, 2012).

Figura 2 – Movimento hidrodinâmico das duas fases líquidas de um instrumento tipo J



(A) Distribuição das fases no interior da coluna em diferentes momentos do movimento (I, II, III e IV). (B) Distribuição das fases em uma volta da coluna espiral.  
Fonte: adaptado de Ito (2014).

As zonas de mistura, que são onde ocorre efetivamente a partição da amostra, circulam pela tubulação, completando uma volta a cada revolução. Os solutos presentes em qualquer porção da coluna se particionam entre as fases nessas zonas de mistura, em uma frequência dependente da velocidade de rotação empregada (ITO, 2005a). Em equipamentos de alta eficiência que operam a velocidades de até 1600 rpm, a frequência com que os solutos sofrem particionamento entre as fases pode chegar a aproximadamente 26 vezes por segundo, o que permite separações com alta resolução, baseado nos diferentes comportamentos de partição dos componentes da amostra (GUZLEK; WOOD; JANAWAY, 2009).

A razão de distribuição de um soluto entre duas fases solventes em equilíbrio é denominada de coeficiente de partição ( $K$ ). Em CCC, é calculado como:

$$K = \frac{C_{FE}}{C_{FM}}$$

onde  $C_{FE}$  é a concentração de soluto na fase estacionária e  $C_{FM}$  na fase móvel. Em um sistema solvente específico, o valor de  $K$  de um analito é um parâmetro invariável, e está relacionado à sua eluição no experimento de CCC. A faixa mais indicada de valores de  $K$  é de 0,4 e 2,5 (FRIESEN; PAULI, 2005). Valores baixos indicam afinidade do soluto pela fase móvel, o que pode levar à eluição junto ao front de solvente, enquanto valores elevados estão associados à maior interação com a fase estacionária, levando a tempos de corrida mais longos (FRIESEN; PAULI, 2005).

#### 4 EVOLUÇÃO DA CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

Em 1949, Craig e Post desenvolveram um equipamento baseado na separação líquido-líquido contracorrente, utilizando uma série de tubos de ensaio contendo a fase estacionária líquida por onde um fluxo de fase móvel passava, com a amostra adicionada no primeiro tubo (SUMNER, 2011). Este sistema com tubos não é mais utilizado, devido à fragilidade e necessidade de grande espaço físico.

No final da década de 1960 foram desenvolvidos os primeiros protótipos de equipamentos de separação contracorrente similares aos utilizados atualmente. Ito e Bowman (1970) chamaram de cromatografia contracorrente a técnica cromatográfica de partição líquido-líquido que desenvolveram usando um tubo helicoidal preenchido com duas fases líquidas imiscíveis, sem a presença de um suporte sólido (ITO; BOWMAN, 1970). Para a formação de equilíbrio hidrostático entre as fases, a coluna helicoidal, preenchida inicialmente com fase estacionária, foi submetida à centrifugação enquanto a fase móvel era introduzida no sistema. Certo volume de fase estacionária permaneceu retido, enquanto a fase móvel era bombeada pela tubulação (ITO; BOWMAN, 1970).

Durante os anos seguintes, desenvolveu-se a cromatografia contracorrente hidrodinâmica (ITO, 1981), empregando além da centrifugação, movimento de rotação em torno do próprio eixo do suporte em que a tubulação está envolta. Desse modo, o campo gravitacional produzido no interior da coluna é variável, e não constante. Estabelece-se um equilíbrio hidrodinâmico entre as fases, sendo que cada uma delas ocupa aproximadamente metade do volume total da coluna. Sistemas hidrodinâmicos oferecem maior grau de mistura e interface entre as fases, promovendo, em geral, um processo de partição mais eficiente (ITO, 2005b).

Visando melhorar a resolução entre os sinais cromatográficos, diversos arranjos geométricos de colunas e eixos de rotação foram desenvolvidos desde então (ITO, 2005b), promovendo também aumento no volume de fase estacionária retida na coluna. O sistema chamado “J” baseia-se em movimentos de rotação e revolução de mesma direção e velocidade angular em eixos paralelos (ITO; BOWMAN, 1977). É utilizado atualmente em equipamentos de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC, do inglês *high-speed countercurrent chromatography*) e cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC, do inglês *high-performance countercurrent chromatography*).

Em HSCCC, o suporte cilíndrico onde a coluna é enrolada é de maior diâmetro, aumentando o raio do movimento de rotação (ITO; SANDLIN; BOWERS, 1982). Esses equipamentos operam a velocidades de rotação que geram forças de aceleração de até 80 vezes a aceleração da gravidade da Terra ( $80 \times g$ ), o que possibilita obter retenção de fase estacionária de mais de 50% do volume total da coluna, além de maior eficiência na separação. De maneira geral, as análises realizadas em equipamentos de HSCCC suportam uma carga de amostra que varia de 0,2 a 0,6 g/h, com duração mínima de 120 min (SUTHERLAND; FISHER, 2009).

Na década de 2000, desenvolveu-se a HPCCC, em que equipamentos com o mesmo mecanismo de funcionamento foram capazes de atingir maiores velocidades (1600 rpm), gerando forças gravitacionais de  $240 \times g$  no interior da coluna (GUZLEK; WOOD; JANAWAY, 2009). Separações por HPCCC tem menor tempo de corrida, na ordem de dezenas de minutos, mantendo boa resolução de análise em escala analítica e preparativa, com carga de amostra de até 103 g/h e alta retenção de fase estacionária (SUTHERLAND; FISHER, 2009).

Guzlek, Wood e Janaway (2009) publicaram um trabalho comparando equipamentos de HSCCC e HPCCC, utilizando como amostra a mistura conhecida como “G.U.E.S.S. mix” (do inglês *Generally Useful Estimate for Solvent Systems*), composta por substâncias de diferentes polaridades e disponíveis comercialmente (FRIESEN; PAULI, 2005). As colunas foram submetidas a movimentos de rotação de diferentes velocidades, dependendo da aceleração centrípeta ( $a_c$ ) desejada, calculada como:

$$a_c = R\omega^2$$

onde R é o raio do rotor, em metros,  $\omega$  é a velocidade rotacional em rad/s. A razão entre a aceleração centrípeta e a aceleração gravitacional da Terra no nível do mar ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ), chamada de força-g, foi utilizada para comparação entre os diferentes instrumentos. A Tabela 1 contém algumas condições (velocidade de rotação, força-g resultante na coluna e fluxo de

fase móvel) e parâmetros avaliados (retenção de fase estacionária e tempo de separação para os componentes da amostra).

Tabela 1 – Condições cromatográficas e resultados obtidos na comparação entre instrumentos de HSCCC e HPCCC operando a diferentes velocidades.

Instrumento	Velocidade (rpm)	Força-g ( $\times g$ )	Fluxo (mL/min)	Retenção de FE (%)	Tempo de corrida (min)
HSCCC	800	54	1,5	68	320
HPCCC	751	54	1,5	73	130
HPCCC	918	80	1,5	77	130
HPCCC	1600	243	1,5	88	105

FE: fase estacionária.

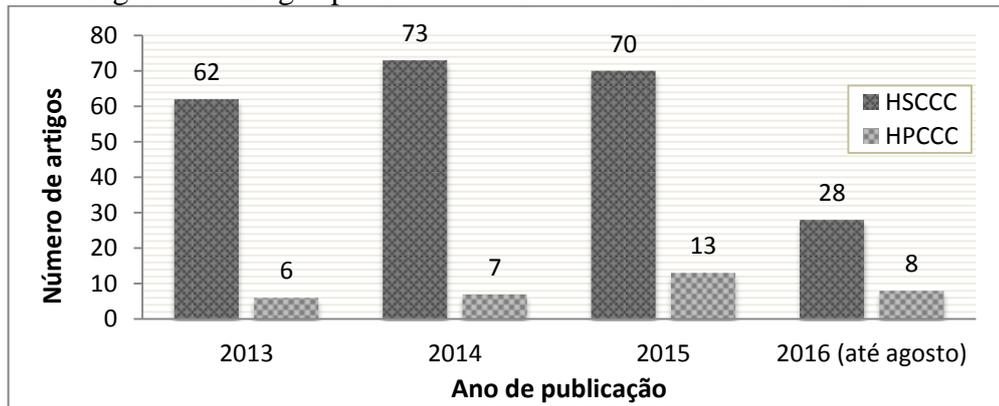
Fonte: Guzlek, Wood e Janaway (2009).

Os resultados permitiram afirmar que com campos gravitacionais de maior intensidade (força-g), mantendo-se o mesmo fluxo de fase móvel, aumenta-se a retenção de fase estacionária, o que leva a separações em menor tempo. Outros resultados ainda evidenciaram que os métodos em HPCCC foram capazes de processar uma quantidade dez vezes maior de amostra, com maior resolução entre os picos (GUZLEK; WOOD; JANAWAY, 2009).

Outro trabalho comparando diferentes instrumentos de CCC foi realizado por Zhang e colaboradores (2012). Foi desenvolvido um método em HPCCC em escala preparativa para separação de geniposídeo de frutos de *Gardenia jasminoides* Ellis. Em comparação com métodos publicados anteriormente, a taxa de transferência (quantidade de amostra bruta processada) e a eficiência (quantidade de composto isolado recuperado) foram, respectivamente, 15 e 8 vezes maiores do que os métodos empregando HSCCC. Também foi realizada uma avaliação de custo-eficiência desses métodos, evidenciando o melhor desempenho do desenvolvido em HPCCC, com  $0,07 \text{ gh}^{-1}\text{\$}^{-1}$ , enquanto as separações em HSCCC obtiveram custo-eficiência entre  $0,002$  e  $0,04 \text{ gh}^{-1}\text{\$}^{-1}$  (ZHANG et al., 2012).

Entretanto, há poucos modelos de equipamentos de HPCCC sendo comercializados, e todos são do mesmo fabricante, Dynamic Extractions. Com base no levantamento realizado na base de dados Scopus, empregando o termo “countercurrent chromatography”, no período de 2013 a 2016, constata-se ainda predominância de publicações envolvendo HSCCC em relação à HPCCC (Figura 3). Em 2013 e 2014 foram publicados cerca de dez vezes mais estudos em HSCCC que em HPCCC. A tendência é que essa diferença diminua, pois em 2015 a razão entre as separações em HSCCC e HPCCC passou para aproximadamente 5,4, e em 2016 está em 3,5.

Figura 3 – Artigos publicados com estudos em HSCCC e HPCCC



Fonte: elaborado pela autora.

O desenvolvimento técnico da CCC ainda está em evolução. Dentre as publicações levantadas na base de dados, aproximadamente 13% eram estudos relacionados a novas metodologias ou modificações instrumentais, estas últimas envolvendo principalmente a geometria da coluna de separação (ENGLERT; VETTER, 2015a).

Os equipamentos em uso atualmente, tanto de HSCCC quanto HPCCC são compostos por uma bomba para fase móvel e fase estacionária, uma válvula de injeção da amostra, a centrífuga com uma ou mais colunas envoltas em suporte cilíndrico, um coletor de frações e um sistema detector (MINGUILLÓN, 2012).

## 5 SISTEMAS SOLVENTES

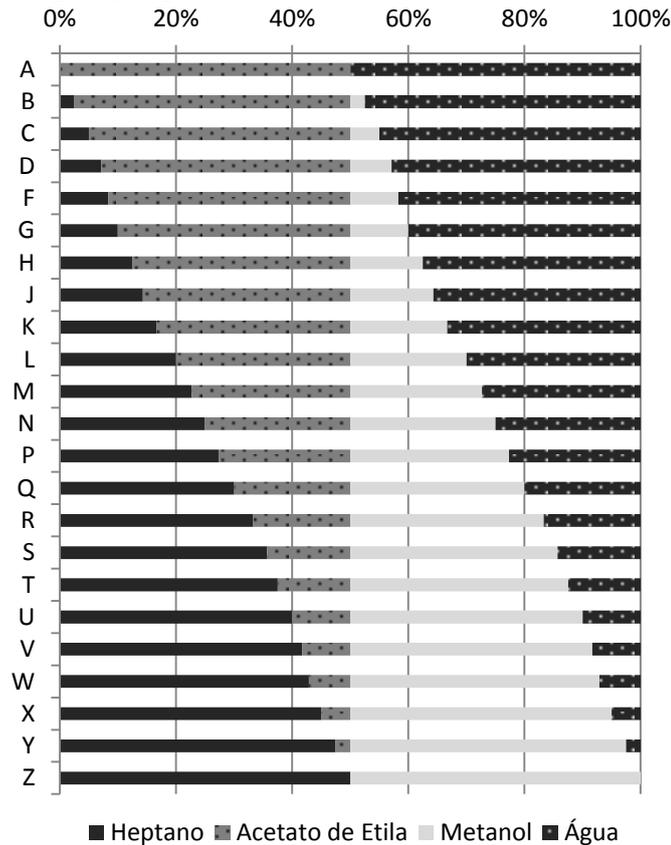
### 5.1 SISTEMAS SOLVENTES TRADICIONAIS

A maior parte dos sistemas solventes bifásicos (SSBs) utilizados em CCC são misturas ternárias ou quaternárias contendo água e solventes orgânicos, que se separam em duas fases, a superior e a inferior. Inicialmente, utilizou-se clorofórmio como principal solvente hidrofóbico, mas devido aos efeitos ambientais e biológicos deletérios associados a solventes clorados, popularizou-se o uso de sistemas contendo alcanos como solvente majoritário da fase superior. Nesse caso, obtém-se uma fase superior orgânica de caráter menos polar, e uma fase inferior aquosa de maior polaridade.

Composições pré-definidas de heptano, acetato de etila, metanol e água são propostas e tabeladas para serem utilizadas como sistemas solvente em CCC e CPC, sendo conhecidas como sistema Arizona, devido à nomenclatura de cada proporção com letras que vão de A a Z (Figura 4). A substituição de heptano por hexano produz mínimas alterações em separações previamente otimizadas com uma proporção do sistema Arizona (BERTHOD; HASSOUN;

RUIZ-ANGEL, 2005). Sistemas que contêm esses solventes em diferentes proporções são eficazes na separação de substâncias em uma ampla faixa de polaridade, abrangendo compostos lipofílicos até moderadamente polares (FRIESEN; PAULI, 2007). Em geral, esses sistemas se separam em duas fases rapidamente, o que está relacionado a processos com boa retenção de fase estacionária (ITO, 2005a).

Figura 4 – Composição percentual (v/v/v/v) das 23 misturas nomeadas de A a Z



Fonte: adaptado de Berthod, Hassoun e Ruiz-Angel (2005).

Skalincka-Woźniak e Garrard (2015) realizaram um levantamento dos SSBs utilizados para purificação de produtos naturais por CCC e CPC no período de 1984 a 2014. Concluíram que não havia distinção entre as duas técnicas, sendo a CPC considerada uma técnica irmã da CCC, apesar de envolver equilíbrio hidrostático entre as fases líquidas. Foram relatados 2594 SSBs diferentes, sendo que aproximadamente 96% dos sistemas isocráticos continham água em sua composição. Os quatro solventes mais listados nas composições de sistemas solventes foram água, acetato de etila, metanol e hexano, evidenciando a popularidade dessa família de solventes, conhecida como HEMWat (do inglês *hexane/ethyl acetate/methanol/water*). Uma grande variedade de compostos tem sido separada com a

utilização dessa família, sendo, na maior parte das vezes, a primeira opção para separação de novas substâncias.

Em geral, compostos de maior polaridade são direcionados à utilização de sistemas com menores proporções de alcano em sua composição. No entanto, essa estratégia pode levar à produção de maior volume de fase inferior que de fase superior, com gasto desnecessário de solventes. Em virtude disso, a separação de amostras de caráter hidrofílico muitas vezes envolve outras abordagens. A segunda família de solventes mais usada, composta por clorofórmio, metanol e água, conhecida como ChMWat (do inglês *chloroform/methanol/water*), é indicada para isolamento de compostos mais polares, entre os quais compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides (FRIESEN; PAULI, 2005). Outra família utilizada em amostras polares é a composta por hexano, butanol e água (HBuWat, do inglês *hexane/butanol/water*), usada na separação, por exemplo, de flavonoides glicosilados e saponinas de menor polaridade (COSTA et al., 2015). Muitas vezes o isolamento de moléculas hidrofílicas, como peptídeos (HU; PAN, 2012), requer a utilização de solventes menos comuns, entre os quais éter metil-*terc*-butílico, diclorometano e acetonitrila (ITO, 2005a).

Para o isolamento de compostos ionizáveis, é possível ajustar o valor de  $K$  pelo controle do pH, utilizando ao invés de água, uma solução aquosa de sulfato de amônia ou ácido trifluoracético, por exemplo (GARRARD, 2005; HU; PAN, 2012). Berthod, Hassoun e Ruiz-Angel (2005) avaliaram os efeitos da modificação do pH em diferentes SSBs na eluição do ácido benzoico, que pode ser encontrado sob a forma neutra, ionizada ou dimérica, quando em presença de heptano, através do tamponamento da água utilizada nos SSBs compostos por heptano e água. Em pH ácido, há o favorecimento da espécie neutra, que tem maior solubilidade na fase superior orgânica, onde ocorre a dimerização. A adição de butanol ao sistema, mantendo o pH, reverteu a formação de dímeros, e conseqüentemente, alterou o valor de  $K$  e eluição do ácido benzoico (BERTHOD; HASSOUN; RUIZ-ANGEL, 2005).

## 5.2 SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Sistemas bifásicos aquosos têm sido utilizados para separação de compostos bioativos, já que preservam a atividade e a conformação das substâncias em solução (FREIRE et al., 2012; LI; WU, 2016). Esses sistemas contém uma concentração apropriada de um par de solutos em água, que são capazes de induzir a separação do sistema aquoso em duas fases. Esses solutos geralmente são um par de polímeros, um par de sais, ou um polímero e um sal.

Em HSCCC, os sistemas bifásicos aquosos mais amplamente utilizados contêm polietilenoglicol (PEG) de alto peso molecular ( $\geq 1000$ ) e algum sal (ZHOU et al., 2014).

Uma vez que as duas fases são compostas por água, a diferença de densidade entre elas é baixa, o que pode acarretar na perda de fase estacionária durante o processo. Uma forma de aumentar a retenção da fase estacionária é alterando a geometria da coluna, o que requer adaptação instrumental (LI; WU, 2016). Outra forma é pela otimização das propriedades físicas do sistema, como aumento de densidade e viscosidade (BEZOLD; GOLL; MINCEVA, 2015).

Líquidos iônicos (LIs) são sais com ponto de fusão abaixo da temperatura ambiente, que tipicamente consistem em um cátion orgânico contendo fósforo ou nitrogênio e um ânion inorgânico. Como características, possuem alta viscosidade e baixa pressão de vapor, sendo utilizados como solventes alternativos aos solventes orgânicos voláteis. As suas propriedades solventes os tornam candidatos para aplicação em processos reacionais e de separação, inclusive CCC (BERTHOD; CARDA-BROCH, 2004). Em geral, compõem, junto com outro sal, SSBs aquosos que resultam em melhor retenção de fase estacionária, em comparação aos sistemas aquosos que utilizam polímeros e sais comuns.

A miscibilidade em água e em outros solventes depende da estrutura do LI. Geralmente se adiciona uma proporção mínima de solvente orgânico à mistura de LI e água, para adequar a viscosidade do SSB. Além disso, a adição de LIs como adjuvantes ao sistema solvente modifica as características da mistura, de modo que pode-se obter melhores parâmetros de separação (FREIRE et al., 2012).

Bezold, Goll e Minceva (2015) fizeram um estudo da aplicabilidade dos LIs com cátions do tipo imidazólio para separação de proteínas por CCC. Foram avaliados LIs com diferentes ânions associados e com três diferentes comprimentos de cadeia lateral do cátion. Os melhores resultados (valor de  $K$  dos analitos e propriedades físicas como densidade e viscosidade das fases) foram observados quando se adicionaram pequenas concentrações (2,5, 5,0 ou 7,5 %) de LI como modificador em sistemas compostos por PEG 600/mistura de sais de fosfato/água. Assim, pode-se fazer um ajuste fino do coeficiente de partição dos solutos, devido ao aumento da solubilidade das proteínas na fase superior (rica em polímero) na presença de um LI no sistema.

### 5.3 OUTROS SISTEMAS SOLVENTES

Sendo a composição do sistema solvente um fator determinante para a separação de compostos por CCC, muitos esforços têm se voltado ao uso de solventes alternativos, quando

os SSBs usuais não são satisfatórios. Alguns desses solventes alternativos agem como modificadores do sistema, que ao interagir com as moléculas alvo permitem sua distribuição em ambas as fases, promovendo um bom isolamento na corrida cromatográfica (FRIESEN; PAULI, 2007).

Por exemplo, para a separação dos isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, que possuem natureza fortemente lipofílica, foi adicionado ao sistema solvente não aquoso hexano/acetonitrila o agente modificador trifluortolueno, que possui um grupo polar trifluorometil ligado ao benzeno. Com a presença do modificador, a fase inferior (acetonitrila) teve sua natureza alterada, pois passou a apresentar propriedades mais apolares, promovendo a partição dos compostos entre as duas fases. O SSB final, hexano/trifluortolueno/acetonitrila (10:3,5:6,5, v/v/v) foi capaz de separar os dois isômeros em tempo satisfatório e boa resolução (ENGLERT; HAMMANN; VETTER, 2015).

Outra abordagem para separação de substâncias com uma ampla faixa de polaridades é a utilização de misturas de solventes que formem um sistema com três fases em equilíbrio. Mesmo os solventes tradicionais da técnica (como hexano, acetato de etila, acetonitrila e água), em razões volumétricas específicas, podem formar um sistema trifásico (LIU et al., 2015c). Há estudos que utilizam uma das três fases como fase estacionária, enquanto as outras duas são eluídas como fase móvel (LIU et al., 2015c); outros em que uma das fases atua como fase móvel e a combinação das outras fases compõe a fase estacionária, formando uma assim chamada 'coluna combinada' (YANAGIDA et al., 2007; YIN et al., 2013); e ainda estudos que utilizam apenas duas das três fases obtidas (WU et al., 2015).

#### 5.4 SELEÇÃO DO SSB

Em CCC, a etapa mais crítica no estudo do isolamento de uma substância é a seleção do SSB. Diferente de outras metodologias de separação, a fase estacionária e a fase móvel não são independentes, pelo contrário, a composição de cada uma das fases está relacionada ao equilíbrio formado entre ambas as fases em um sistema de diferentes solventes. Por essa razão, não é possível escolher a fase estacionária separadamente da fase móvel. São escolhidas em uma mesma etapa, em que é avaliada a natureza e a proporção de cada componente da mistura de solventes que formará as duas fases.

Segundo Ito (2005a), alguns requisitos são indispensáveis para o SSB selecionado:

- 1) os analitos devem ser solúveis e estáveis no sistema;

2) a separação dos solventes em duas fases distintas deve ocorrer em tempo inferior a 30 segundos, para garantir um percentual satisfatório de retenção de fase estacionária na coluna;

3) as duas fases formadas devem ter razão volumétrica aceitável, de forma que não haja perda excessiva de solvente;

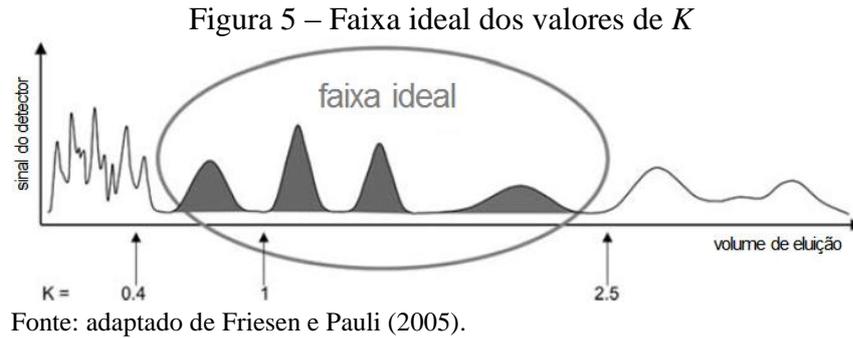
4) o sistema deve fornecer coeficientes de partição adequados para os compostos alvo, possibilitando uma separação com boa resolução.

#### 5.4.1 SELEÇÃO EMPÍRICA

A forma mais direta de se escolher o SSB é utilizando equipamentos de CCC analíticos (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). As colunas de escala analítica possuem capacidade de aproximadamente 20 mL, podendo ser utilizadas como triagem para separações em escalas maiores. Essa abordagem de seleção requer conhecimento prévio do comportamento entre a amostra e as famílias de sistemas solventes e depende de disponibilidade instrumental, o que limita sua aplicação. As estratégias que têm sido mais utilizadas para a seleção do SSB envolvem processos iterativos de determinação dos valores de  $K$  em experimentos de partição ou dos fatores de retenção ( $R_f$ ) em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (FRIESEN et al., 2015).

Para os experimentos de partição, geralmente se utiliza uma amostra padrão, que é dissolvida no SSB testado. Após o equilíbrio, é feita a quantificação do analito em cada uma das fases, e a partir desses resultados é calculado o valor de  $K$  para um determinado SSB. Uma vez que valores iniciais são conhecidos, novos experimentos são conduzidos, até que se chegue a um valor de  $K$  adequado (GARRARD, 2005).

As faixas de  $K$  indicadas para corridas de CCC são variáveis, mas em geral são recomendados valores maiores que 0,4. Coeficientes muito baixos estão associados à baixa resolução dos picos (ITO, 2005a), e, principalmente, à eluição próxima ao frente do solvente (HU; PAN, 2012). Já os valores maiores que 2,5 indicam maior interação com a fase estacionária, levando a corridas mais longas e picos mais largos (FRIESEN; PAULI, 2005). A Figura 5 ilustra a faixa ideal de coeficiente de partição relacionada à resolução dos picos no cromatograma. Além disso, quando se visa a separação e o isolamento de um grupo de analitos, a razão entre os valores de  $K$  dos compostos deve ser levada em consideração. Essa razão, conhecida como fator de separação  $\alpha$ , deve ser maior que 1,5, para obtenção de uma boa resolução entre os sinais (ITO, 2005a).



Obtendo-se o valor de  $K$  do analito em equilíbrio estático é possível inferir com boa correlação o valor de  $K$  no mesmo SSB produzido no equilíbrio hidrodinâmico de CCC (LIU et al., 2015b), o que justifica o amplo uso dessa estratégia em grande parte dos estudos (FRIESEN et al., 2015). Como a possibilidade de combinações de solventes é praticamente infinita, alguns protocolos foram montados, para auxiliar na busca sistemática de um SSB adequado. A Tabela 2 traz 28 proporções, sendo que as proporções destacadas podem ser testadas inicialmente e, conforme o resultado de  $K$  obtido, testar proporções mais acima ou mais abaixo na tabela, que correspondem a SSB mais ou menos polares, respectivamente.

Existem sistemas automatizados para manipulação de líquidos, que realizam os experimentos de partição testando diversas combinações de SSB simultaneamente, economizando tempo e esforço operacional (GARRARD, 2005). No entanto, poucos laboratórios dispõem dessa capacidade, e a seleção empírica do SSB é uma etapa bastante dispendiosa no desenvolvimento de uma metodologia por CCC.

Uma forma mais simples de guiar a escolha do SSB é por CCD, onde uma porção de amostra é dissolvida em SSB com mesmo volume de fase inferior e superior. Frações coletadas de ambas as fases são aplicadas em uma placa cromatográfica de sílica e eluídas com a fase menos polar (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006), e avaliam-se então os valores de  $R_f$  dos componentes a serem separados, sendo que resultados próximos a 0,5 são promissores para separações em CCC. Utilizando diferentes proporções das famílias de solventes HEMWat e ChMWat, Friesen e Pauli (2005) demonstraram a relação existente entre os valores  $R_f$  e os coeficientes de partição obtidos experimentalmente. É desejável que os valores de  $R_f$  sejam entre 0,29 e 0,71, pois estão relacionados a valores de  $K$  entre 0,4 e 2,5. No entanto, esta correspondência não necessariamente implica um bom resultado em CCC com o SSB selecionado, já que o mecanismo de separação por CCD envolve também, além da partição, a adsorção da amostra no suporte (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Tabela 2 – Volumes de solventes (em mL) para testes de partição.

Nº	Heptano	AEt	MeOH	BuOH	Água
1	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00
2	0,00	0,40	0,00	1,60	2,00
3	0,00	0,80	0,00	1,20	2,00
4	0,00	1,20	0,00	0,80	2,00
5	0,00	1,60	0,00	0,40	2,00
6	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00
7	0,10	1,90	0,10	0,00	1,90
8	0,20	1,80	0,20	0,00	1,80
9	0,29	1,71	0,29	0,00	1,71
10	0,33	1,67	0,33	0,00	1,67
11	0,40	1,60	0,40	0,00	1,60
12	0,50	1,50	0,50	0,00	1,50
13	0,57	1,43	0,57	0,00	1,43
14	0,67	1,33	0,67	0,00	1,33
15	0,80	1,20	0,80	0,00	1,20
16	0,91	1,09	0,91	0,00	1,09
17	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
18	1,09	0,91	1,09	0,00	0,91
19	1,20	0,80	1,20	0,00	0,80
20	1,33	0,67	1,33	0,00	0,67
21	1,43	0,57	1,43	0,00	0,57
22	1,50	0,50	1,50	0,00	0,50
23	1,60	0,40	1,60	0,00	0,40
24	1,67	0,33	1,67	0,00	0,33
25	1,71	0,29	1,71	0,00	0,29
26	1,80	0,20	1,80	0,00	0,20
27	1,90	0,10	1,90	0,00	0,10
28	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00

AEt: acetato de etila; MeOH: metanol; BuOH: butanol.

Fonte: adaptado de Garrard (2005).

#### 5.4.2 SELEÇÃO SEMIEMPÍRICA

A predição ou estimativa do valor de  $K$  por modelos matemáticos tem sido estudada para facilitar a escolha do SSB ideal. Diferente da predição bastante acurada do coeficiente de partição octanol/água, a estimativa do coeficiente de partição em um SSB de CCC é uma operação mais complexa (REN et al., 2015). Para prever o comportamento do analito em solução, não é apenas sua polaridade que é levada em consideração. A estimativa é feita em cima das propriedades termodinâmicas do analito e dos solventes que compõem o SSB (FRIESEN et al., 2015).

Ren e colaboradores (2016) empregaram um método semiempírico para seleção do SSB para separação de sete componentes de *Spirodela polyrrhiza* (L.) com diferentes polaridades. A estratégia computacional utilizada no trabalho, NRTL-SAC (do inglês

*nonrandom two-liquid segment activity coefficient*), requer o resultado de três a cinco experimentos de partição para poder prever o valor de  $K$  em diferentes proporções de SSB, mesmo que em famílias de solventes distintas (REN et al., 2015). Enquanto as características termodinâmicas dos solventes utilizados podem ser extraídas da literatura, os valores experimentais de  $K$  são necessários para determinação dos parâmetros moleculares dos solutos: hidrofobicidade, hidrofiliçidade, polaridade e força de solvatação. Com esses dados, a estrutura dos compostos alvo não precisa ser informada, o que é interessante quando se deseja separar produtos naturais cuja estrutura molecular ainda é desconhecida (REN et al., 2013).

### 5.4.3 SELEÇÃO TEÓRICA

Para métodos completamente teóricos, a solubilidade de cada composto é calculada independentemente em cada uma das fases. É necessário conhecer, além da composição da fase e da estrutura molecular dos solventes, a estrutura molecular do analito, pois os modelos *in silico* levam em conta as características geométricas das moléculas envolvidas. O processo completo, até chegar ao cálculo do coeficiente de partição, requer pelo menos três plataformas de softwares diferentes (LIU et al., 2015b), o que limita a aplicação apenas de estratégias computacionais para escolha do SSB.

Frey, Hopmann e Minceva, (2014) avaliaram os coeficientes de partição de 14 solutos, em cinco famílias de SSBs diferentes, utilizando os modelos termodinâmicos conhecidos como UNIFAC (do inglês *Universal Quasichemical Functional-group Activity Coefficients*) e COSMO-RS (do inglês *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*). Os valores de  $K$  foram obtidos de três formas: através de experimentos de partição, realizados pelos autores ou extraídos da literatura; calculados somente por dados teóricos acerca das estruturas dos solutos e dos solventes; ou calculados teoricamente a partir de resultados experimentais relativos ao equilíbrio líquido-líquido entre os solventes. De modo geral, os três resultados de  $K$  para um soluto em determinado SSB foram muito próximos, evidenciando a aplicabilidade dos modelos teóricos na escolha do SSB para uso em CCC. Os autores destacam a superioridade do modelo preditivo COSMO-RS, em que estruturas moleculares mais complexas de solutos ou solventes podem ser avaliadas.

## 6 MODOS DE ELUIÇÃO

As aplicações mais convencionais de CCC utilizam um sistema solvente em modo de eluição isocrático para separação de componentes majoritários de misturas complexas

(BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2009). Diversas alternativas têm sido empregadas visando o isolamento de compostos de diferentes polaridades ou corridas de menor duração, como por exemplo a eluição em gradiente de polaridade. No entanto, alterar o modo de eluição pode comprometer a retenção da fase estacionária na coluna, já que afeta o equilíbrio líquido-líquido entre as duas fases (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Os modos de eluição tradicionais em CCC são classificados em normal e reverso, como em cromatografia líquida. No modo normal de operação, a fase inferior do SSB é utilizada inicialmente para preencher a coluna. Então, enquanto a coluna realiza o movimento giratório em dois eixos, é iniciado o bombeamento de fase móvel (a fase superior) para estabelecimento do equilíbrio entre as duas fases no interior da coluna. Atingido o equilíbrio, a amostra é injetada e as frações eluídas são detectadas, caso haja um sistema de detecção acoplado, e coletadas de acordo com o volume desejado. Para o modo de operação reverso, a fase superior é usada como fase estacionária enquanto a fase inferior atua como fase móvel.

### 6.1 ELUIÇÃO GRADIENTE

Alterar a proporção dos solventes da fase móvel durante a corrida de CCC, ou seja, utilizar uma eluição em modo gradiente de polaridade, foi uma das primeiras estratégias empregadas para separação de componentes com uma ampla faixa de valores de  $K$  de uma mistura complexa. Para evitar a perda de fase estacionária durante este processo, o ideal é que o SSB seja robusto, mantendo a composição da fase estacionária estável mesmo quando a composição da outra fase é alterada (IGNATOVA et al., 2011).

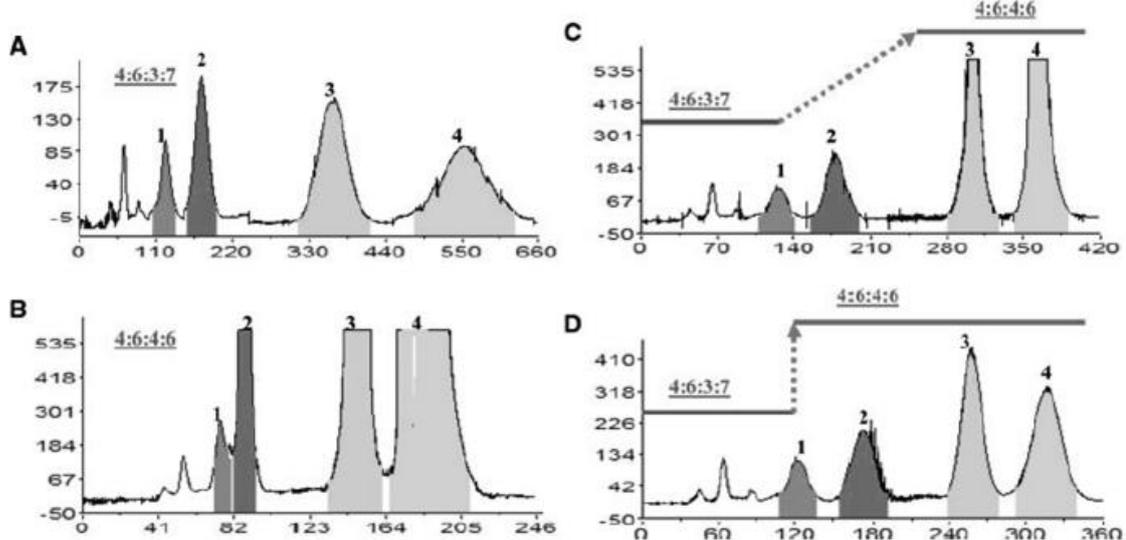
O gradiente pode ser linear ou não, sendo que em um gradiente linear a mudança da polaridade ocorre de forma gradual, e no gradiente não-linear, a polaridade é alterada abruptamente. Este último é o mais empregado, onde em algum ponto da corrida com o SSB primário é bombeada uma nova fase móvel (HUANG et al., 2016). Tipicamente, em uma corrida em modo reverso, a nova fase móvel é composta por uma proporção menos polar dos mesmos solventes utilizados no SSB original, para eluir os analitos de menor polaridade. Há poucos estudos em que a segunda fase móvel empregada é composta por solventes diferentes daqueles usados para formulação do SSB original (FRIESEN et al., 2015).

Yang e colaboradores (2013) isolaram quatro podofilotoxinas com modos de eluição isocráticos e gradiente, utilizando os SSB compostos por hexano/acetato de etila/metanol/água (4:6:3:7 e 4:6:4:6, v/v/v/v). Os testes foram realizados em HSCCC em modo reverso, variando a composição da fase móvel composta por metanol e água. Em relação às eluições isocráticas (Figura 6A e 6B), os modos de gradiente linear (Figura 6C) e não-linear (Figura

6D) apresentaram melhor resolução. Ainda, o gradiente não-linear apresentou menor tempo de corrida (360 min) em relação ao gradiente linear (420 min).

Para otimizar a separação de compostos com valores de  $K$  muito diferentes também pode ser usado um gradiente de fluxo. O aumento da vazão de fase móvel durante a corrida permite diminuir o tempo de separação para compostos com afinidade pela fase estacionária (HUANG et al., 2016). Entretanto, a resolução pode ser afetada, devido à maior perda de fase estacionária causada por fluxos mais elevados (LEITÃO; COSTA, 2015).

Figura 6 – Perfil de separação de podofilotoxinas (1, 2, 3 e 4) com SSB HEMWat



Eixo x: tempo (min). Eixo y: absorvância (mAU).

(A) Eluição isocrática 4:6:3:7. (B) Eluição isocrática 4:6:4:6. (C) Eluição com gradiente linear: 0 – 120 min, 100% 4:6:3:7; 120 – 255 min, 4:6:3:7 de 100% a 0 e 4:6:4:6 de 0 a 100%; após 255 min, 100% 4:6:4:6. (D) Eluição com gradiente não linear: 0 -120 min, 100% 4:6:3:7; após 120 min, 4:6:4:6.

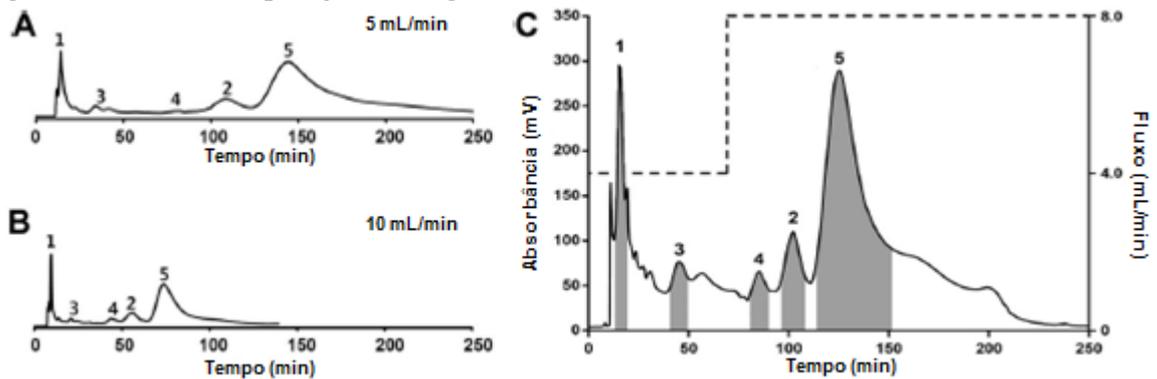
Fonte: adaptado de Yang e colaboradores (2013).

Todavia, Ko e colaboradores (2013) conseguiram resultados com melhor resolução aplicando um gradiente de fluxo durante o processo de separação. Foram testados diferentes fluxos para a separação por HPLC de cinco oligostibenos, após otimização do SSB hexano/acetato de etila/metanol/água (4:8:4:10, v/v/v/v) utilizado em modo reverso (Figura 7). Ao dobrar o fluxo, de 5 para 10 mL/min, a pureza do composto 3 caiu para menos de 90%. Foi testado, então, um gradiente, em que um fluxo de 4 mL/min foi mantido nos 70 min iniciais, a partir de onde passou para 8 mL/min. A alta velocidade atingida pelo equipamento de HPLC (até 1600 rpm) foi capaz de reter 65% de fase estacionária na coluna, mesmo com alta vazão de fase móvel. Dessa forma, aplicando-se o gradiente de fluxo todos os compostos foram separados com boas resoluções e purezas.

Já para compostos ionizáveis que quando em sua forma neutra possuem valores de  $K$  muito próximos, pode ser aplicado um gradiente de pH. Durante a eluição, são bombeadas

fases móveis aquosas ajustadas a diferentes valores de pH, de acordo com o  $pK_a$  dos ácidos ou bases que se deseja separar. O pH inicial deve, por exemplo, promover a ionização apenas dos compostos de maior acidez, favorecendo o deslocamento de seu equilíbrio para fase móvel. Com o aumento do pH, em um gradiente gradual ou intermitente, o processo de ionização e deslocamento ocorrerá da mesma forma com os compostos menos ácidos, promovendo a sua eluição em diferentes frações (DUANMU et al., 2010; FRIESEN et al., 2015).

Figura 7 – Perfil de separação de oligostibenos (1, 2, 3, 4 e 5) com SSB HEMWat (4:8:4:10)



(A) Fluxo de 5 mL/min. (B) Fluxo de 10 mL/min. (C) Gradiente de fluxo de 4 mL/min (0 – 75 min) a 8 mL/min (75 – 250 min).

Fonte: adaptado de Ko e colaboradores (2013).

## 6.2 ELUIÇÃO COM EXTRUSÃO

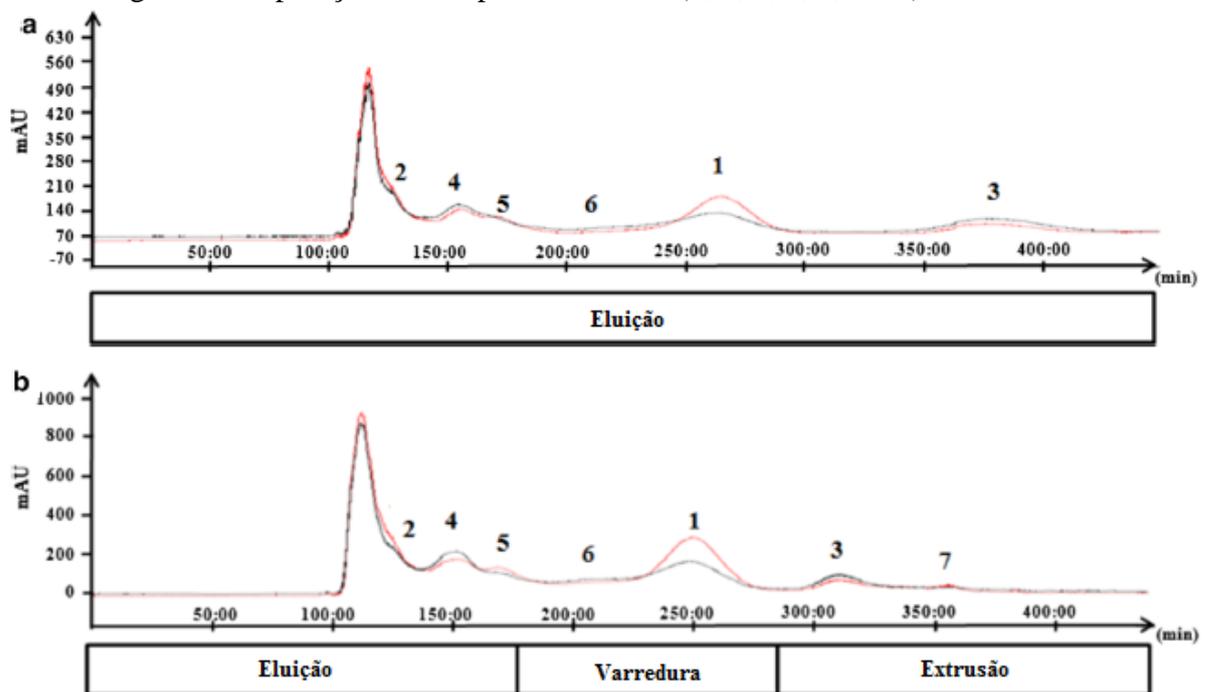
A aplicação da eluição de extrusão é voltada para amostras complexas, em que os solutos possuem grandes diferenças de polaridade entre si. O objetivo é acelerar a eluição dos compostos retidos na fase estacionária, ou seja, aqueles com maiores valores de  $K$ , que levariam mais tempo para serem eluídos na fase móvel (HU; PAN, 2012).

A primeira parte do processo é uma eluição convencional. Após o bombeamento de um determinado volume de fase móvel, a eluição é continuada substituindo-se a fase móvel pela estacionária, que passa a ser bombeada continuamente. Essa etapa é chamada de varredura, pois ainda há fase móvel sendo eluída. Após a eluição completa da fase móvel que havia na coluna, ocorre a extrusão propriamente dita, em que tanto a coluna quanto o eluente são compostos apenas pela fase estacionária. Esta, retida inicialmente na coluna, é eluída completamente, permitindo que todos os componentes sejam separados e recuperados (WU; CAO; WU, 2012). Dessa forma, esse método reduz o consumo de solventes e o tempo de separação (HUANG et al., 2016).

Em estudo realizado em escala preparativa (volume total da coluna de aproximadamente 1000 mL) com a extrusão da fase estacionária, Paek e Lim (2014) separaram sete compostos naturais de raízes de *Nardostachys chinensis* com atividade

farmacológica, cujos valores de  $K$  variavam de 0,49 a 4,23. A etapa de varredura, ou seja, o bombeamento de fase estacionária, iniciou aos 180 min, com fluxo de 5 mL/min. Aos 280 min, aproximadamente, a coluna foi preenchida completamente com a fase estacionária, e então iniciou-se a etapa de extrusão dos compostos mais retidos. A eluição convencional, durante o mesmo tempo de corrida, não foi capaz de separar um dos componentes, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 – Separação de compostos naturais (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) de *N. chinensis*



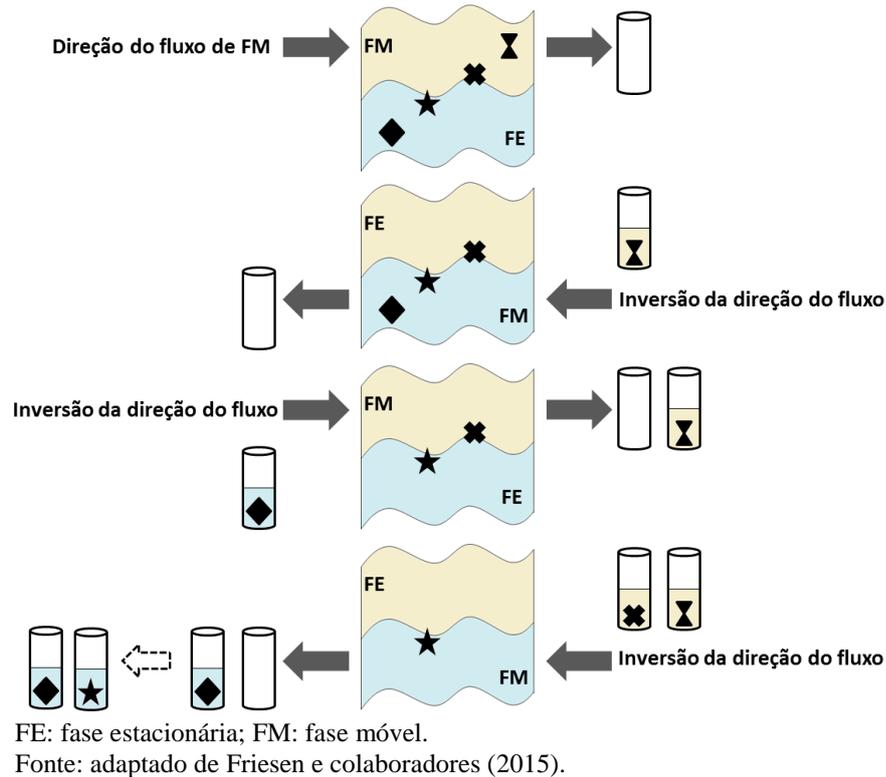
(a) Eluição convencional. (b) Eluição com extrusão.  
Fonte: adaptado de Paek e Lim (2014).

### 6.3 ELUIÇÃO EM MODO DUPLO

Na eluição em modo duplo, a fase que está sendo bombeada é trocada pela outra fase, com a troca simultânea da direção do fluxo (ENGLERT; VETTER, 2015a). De maneira análoga à eluição de extrusão, os solutos retidos na fase estacionária durante a primeira parte da corrida serão eluídos no segundo modo de eluição. O ponto em que ocorrerá a troca do modo de operação é crítico, para que não ocorra eluição parcial do analito em ambas as fases (FRIESEN et al., 2015).

É possível realizar diversos ciclos de inversão em uma mesma análise, estratégia chamada de modo duplo múltiplo (Figura 9). Após a primeira troca de modo de eluição, ocorre uma nova troca, para voltar ao modo de eluição primário, o que tem efeito de prolongamento do volume da coluna, melhorando as resoluções dos picos.

Figura 9 – Esquema de operação do modo duplo múltiplo

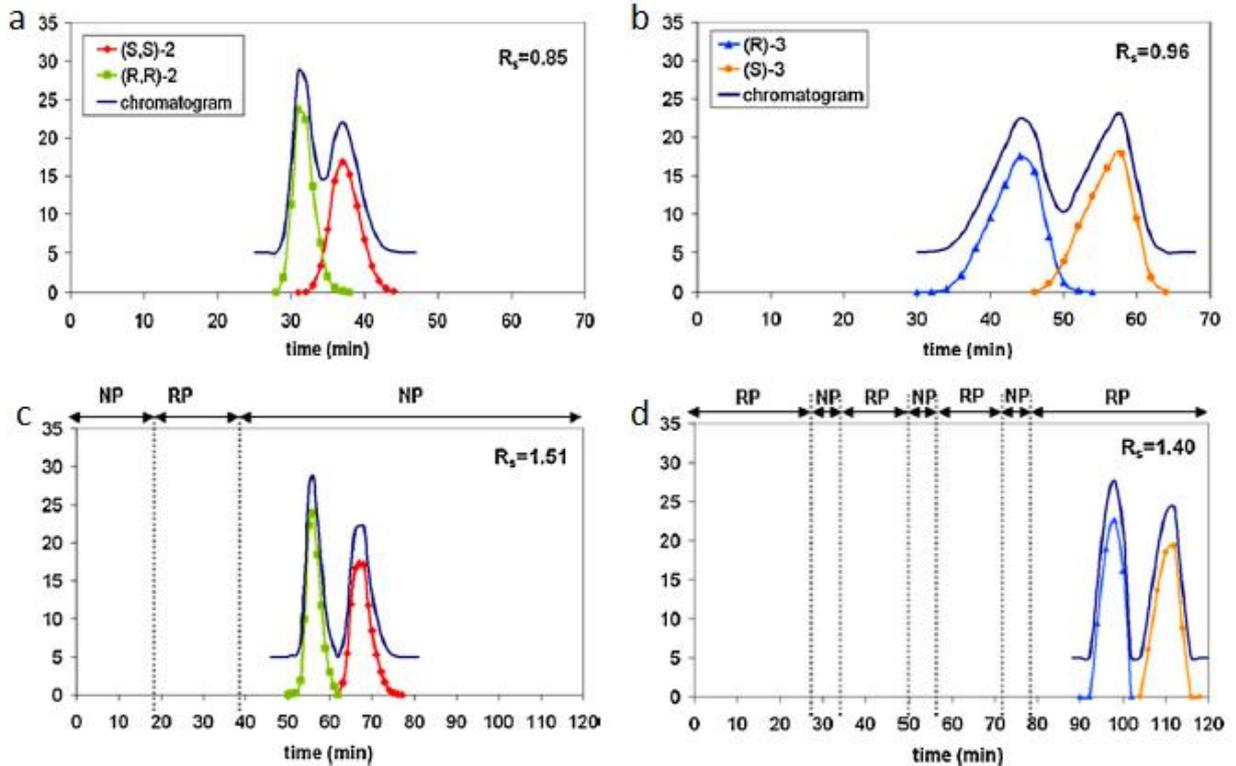


Rubio e colaboradores (2009) relataram a primeira aplicação da eluição em modo duplo múltiplo para separações quirais por CCC. Foram avaliadas as separações de enantiômeros de duas misturas racêmicas, chamadas 2 e 3, utilizando como seletor quiral o mesmo derivado de (*S*)-naproxeno. Os SSBs foram otimizados em corridas com eluição clássica, entretanto sem atingir fator de resolução maior que 1,0. Testaram então os modos duplo e duplo múltiplo de eluição. Para um dos racematos, a melhor resolução foi obtida com apenas um ciclo de inversão de eluição das fases, enquanto o outro apresentou melhor resultado de resolução após três ciclos (Figura 10). Os autores atribuem os resultados distintos a diferentes mecanismos de partição e reconhecimento quiral, e apontam os modos de eluição alternativos como estratégia para otimização de enantioseparações por CCC.

#### 6.4 RECICLAGEM

Na cromatografia com reciclagem de eluição, o efluente da coluna é retornado a ela continuamente até que se consiga a separação desejada. É como se a coluna fosse expandida, o que aumenta a eficiência de separação (KOSTANYAN, 2015). É preciso uma adaptação instrumental, para que a tubulação de saída do detector esteja conectada à tubulação de entrada da bomba de fase móvel. A quantidade de solvente consumida não se altera, mas há um prolongamento da duração do experimento (HUANG et al., 2016).

Figura 10 – Perfis de separação dos pares de enantiômeros 2 e 3



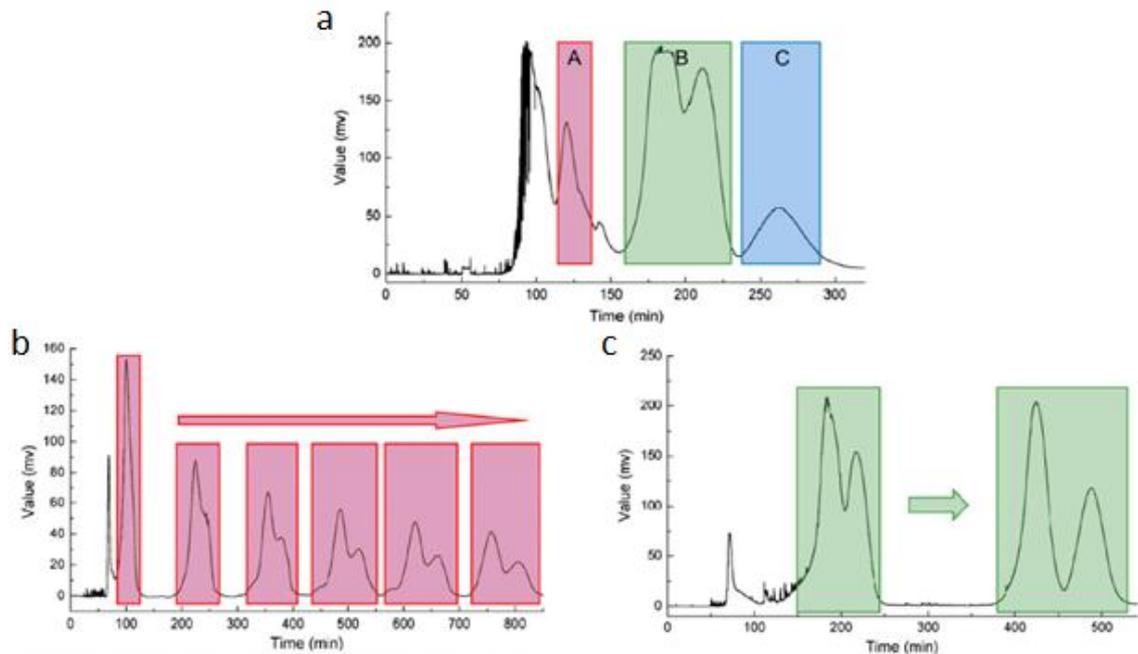
R: Resolução. NP: Fase normal. RP: Fase reversa. (a) Eluição clássica em modo normal para a separação dos enantiômeros 2. (b) Eluição clássica em modo reverso para a separação dos enantiômeros 3. (c) Eluição em modo duplo múltiplo para a separação dos enantiômeros 2. (d) Eluição em modo duplo múltiplo para a separação dos enantiômeros 3.

Fonte: adaptado de Rubio e colaboradores (2009).

Além disso, uma desvantagem inerente a essa técnica é o alargamento dos sinais cromatográficos. Com o aumento do número de ciclos, os picos são estendidos, até o limite em que se deve interromper a reciclagem, para evitar a sobreposição dos sinais. Por este motivo, esta estratégia não é indicada para separação de múltiplos solutos (HUANG et al., 2016), sendo seu uso mais promissor na separação de compostos quirais (TONG et al., 2011).

Amostras de maior complexidade requerem um tratamento prévio, de forma que se eliminem os solutos indesejados, ou se obtenham frações mais simples dos compostos alvo. Para a separação de polifenóis, Liu e colaboradores (2015a) fizeram uma pré-purificação do extrato de *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder por HSCCC convencional. Após, duas frações em que houve coeluição de compostos de interesse foram submetidas à HSCCC com reciclagem, que foi efetiva na separação dos compostos de estrutura similar que não haviam sido resolvidos pela técnica convencional (Figura 11).

Figura 11 – Cromatogramas do extrato vegetal e suas frações



(a) Cromatograma do extrato vegetal por HSCCC convencional, onde foram coletadas as frações A, B e C. (b) Cromatograma da fração A por HSCCC com reciclagem. (c) Cromatograma da fração B por HSCCC com reciclagem.

Fonte: adaptado de Liu e colaboradores (2015a)

### 6.5 REFINAMENTO POR ZONA DE pH

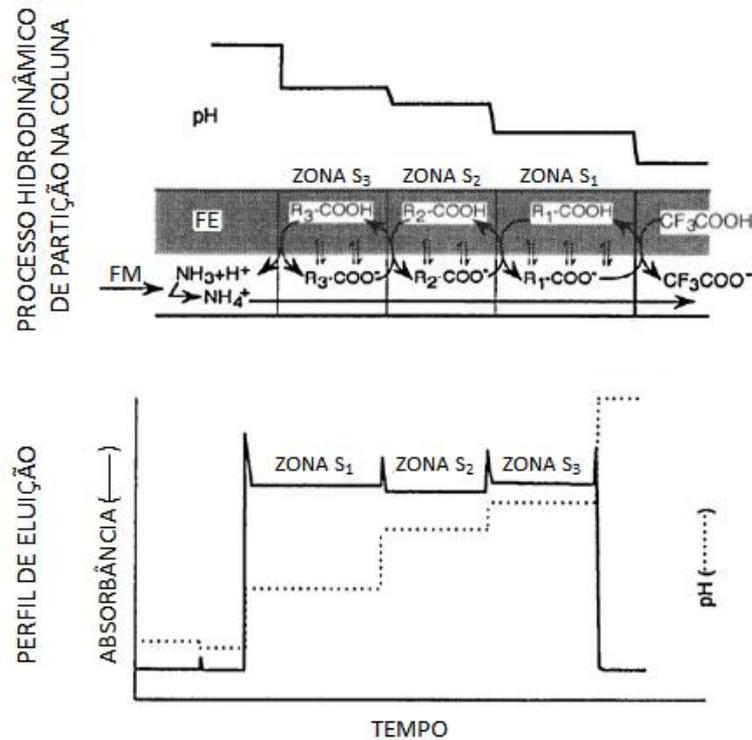
Na década de 1990 desenvolveu-se a técnica de CCC com refinamento por zona de pH, que separa compostos ionizáveis utilizando modificadores de natureza ácida e básica no SSB. Diferente do modo de eluição em gradiente de pH, em que a adição de base ou ácido é feita somente na fase móvel (HUANG et al., 2016), no refinamento por zona de pH há adição de baixas concentrações de modificadores de pH em ambas as fases do sistema.

Pela combinação da adição de um agente de retenção na fase estacionária e de um agente de eluição na fase móvel é possível reter os analitos e fazer uma eluição modulada de acordo com suas diferenças de polaridade e  $pK_a$  (MINGUILLÓN, 2012). É uma estratégia para otimização da separação que tem sido utilizada em instrumentos convencionais de CCC em escala preparativa, principalmente para separação de alcaloides, ácidos orgânicos, aminoácidos e peptídeos (HUANG et al., 2016; SONG et al., 2016). Os sinais cromatográficos geralmente formam picos retangulares fundidos com mínima sobreposição, com a concentração das impurezas formando picos nas bordas dos sinais principais (ITO, 2013).

Para a separação de ácidos pelo refinamento por zona de pH, a coluna é inicialmente preenchida com a fase estacionária superior contendo o agente de retenção, por exemplo, ácido trifluoroacético (TFA). Após injeção da solução amostra, é bombeada a fase móvel sob a

velocidade de rotação desejada. Com o fluxo de fase móvel aquosa contendo um agente de eluição, como amônia ( $\text{NH}_3$ ), o TFA vai sendo neutralizado gradativamente, criando zonas bem definidas de diferentes valores de pH (ITO, 2013). A Figura 12 mostra o equilíbrio estabelecido na coluna entre a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM) para separação de três analitos  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ .

Figura 12 – Mecanismo da CCC com refinamento por zona de pH



FE: Fase estacionária. FM: Fase móvel.

Fonte: adaptado de Ito (2013).

Neste esquema, os analitos ficam desprotonados na fase móvel devido à presença de  $\text{NH}_3$ , deslocando o equilíbrio para a fase estacionária de baixo pH. O analito mais polar e de menor  $\text{pK}_a$  ( $S_1$ ), ou seja, o de maior caráter ácido, irá eluir primeiro, pois seu equilíbrio estará mais deslocado para a formação da espécie ionizada, que tem maior afinidade pela fase móvel aquosa. Já o ácido de maior  $\text{pK}_a$  e hidrofobicidade será o último a ser eluído.

A concentração de compostos alvo na fase móvel é dependente da concentração do agente eluidor, pois se encontram em equilíbrio. Portanto, quanto maior a concentração deste último, mais concentradas serão as frações coletadas. No entanto, é desejável que as quantidades de agente eluidor e fixador sejam aproximadamente equimolares. O excesso de agente eluidor pode acarretar na eluição dos primeiros compostos junto ao front de solvente, e o excesso de agente fixador pode ocasionar tempos de retenção muito longos (ITO, 2013).

Alguns ácidos graxos saturados e insaturados possuem mesmo coeficiente de partição e são coeluídos em separações por CCC. Englert e Vetter (2015b) utilizaram o refinamento por zona de pH para separação de ácidos graxos de óleo de girassol, com SSB composto por n-hexano/acetonitrila/metanol/água (4:7:1,4/0,5 v/v/v/v). Foram adicionados 20 mM de  $\text{NH}_3$  na fase inferior e 35 mM de TFA na fase superior, sendo que foram testadas corridas em modo normal e em modo reverso. No modo reverso ainda houve coeluição de alguns ácidos, mas no modo normal ( $\text{NH}_3$  como agente de retenção e TFA como agente de eluição) os analitos foram recuperados com pureza maior de 95%. Como esperado, os primeiros ácidos a eluir foram aqueles com menores valores de  $\text{pK}_a$ . Na sequência, no entanto, a diferença entre os valores de  $K$  foi mais impactante para a separação, evidenciando que tanto a acidez quanto a hidrofobicidade dos analitos estão envolvidas no mecanismo de refinamento por zona de pH.

Neste estudo, a separação dos mesmos compostos por CCC convencional em modo normal e reverso também foi avaliada. Além da coeluição de alguns ácidos, devido ao mesmo coeficiente de partição, a capacidade de alimentação de amostra foi dez vezes menor em relação à CCC com refinamento de zona de pH (ENGLERT; VETTER, 2015b). Segundo Ito (2013), este aumento na capacidade de carga de amostra é uma das principais vantagens em relação à CCC tradicional, junto com a obtenção de frações altamente concentradas, entre outros. Além disso, o monitoramento da separação pode ser feito pela medida do pH, o que é de grande importância quando os compostos alvo não possuem grupos cromóforos em sua estrutura.

## 7 SISTEMAS DE DETECÇÃO

Embora seja recomendado o monitoramento contínuo do processo de separação, não é necessário que exista um sistema de detecção acoplado ao equipamento de CCC. Uma vez que o SSB e as condições cromatográficas estejam definidos, as frações coletadas podem ser analisadas posteriormente por CLAE, CCD, ou outra técnica adequada. No entanto, tal estratégia requer uma etapa adicional, que em grande parte dos estudos envolve a secagem das frações e dissolução dos resíduos em solventes apropriados (ITO, 2005a), o que prolonga consideravelmente o tempo experimental e ainda pode levar à degradação dos compostos (MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2014).

De modo geral, as metodologias desenvolvidas em CCC podem ser acopladas aos mesmos detectores utilizados em cromatografia líquida. A detecção por UV-visível de forma

contínua é a de maior emprego, sendo que 87% dos cromatogramas apresentados em isolamento de produtos naturais por CCC empregam esta técnica (FRIESEN et al., 2015). É um detector não destrutivo e de uso consagrado, mas é aplicável somente em compostos com presença de grupos cromóforos em suas estruturas.

Entretanto, muitas das moléculas separadas por CCC não absorvem, ou absorvem muito pouca energia na faixa UV. É o caso, por exemplo, de saponinas e terpenoides, que têm sido separados por CCC acoplada a detector evaporativo por espalhamento de luz (ELS, do inglês *evaporative light scattering*) (SONG et al., 2016). Por esta técnica, o eluente da coluna é nebulizado, e então a fase móvel é evaporada em condições controladas para que os analitos não volatilizem. A incidência de luz nas partículas do analito sofre espalhamento de acordo com a concentração, que é medido e gera um sinal cromatográfico. A evaporação do solvente em detectores ELS é uma vantagem quando há perda de fase estacionária durante a análise. Os solventes da fase estacionária são interferentes, podendo alterar a linha de base no cromatograma gerado pela detecção on-line por UV (MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2014).

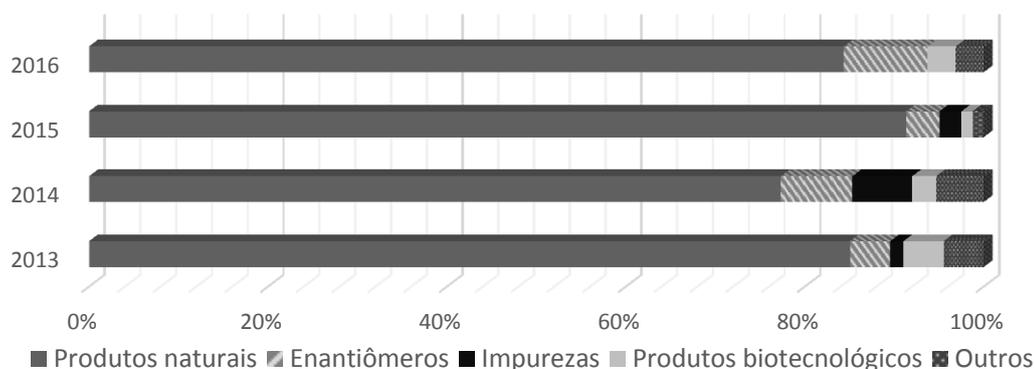
Juntos, os cromatogramas com detecção por UV-vis e ELS representam aproximadamente 96% das separações de produtos naturais por CCC (FRIESEN et al., 2015). Existem estudos envolvendo o monitoramento do eluente de CCC por técnicas que forneçam informações estruturais, como ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H) (HAMMANN; CONRAD; VETTER, 2015) e, principalmente, espectrometria de massas (EM). A EM é a técnica de detecção universal, que oferece grande sensibilidade e especificidade. Contudo, a interface instrumental com o detector traz algumas dificuldades, relacionadas sobretudo à forte pressão gerada pelos sistemas de ionização (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

## 8 APLICAÇÕES DA CCC

Pelo levantamento realizado na base de dados Scopus, foram contabilizados 306 publicações na área entre 2013 e agosto de 2016 em que foi possível acesso ao texto completo. Destas, 12 artigos (3,92%) eram de revisão, e 39 (12,75%) envolviam o desenvolvimento de novos instrumentos ou de novos modelos teóricos para CCC. Os 255 artigos restantes (83,33%), com a aplicação prática da CCC, foram categorizados de acordo com os compostos separados entre: produtos naturais, enantiômeros, impurezas, produtos

biotecnológicos e outros (Figura 13). A predominância de estudos relacionados à separação de produtos de origem natural é evidente, embora possa ser utilizada com outras finalidades.

Figura 13 – Publicações de acordo com a área de aplicação dos compostos separados



Fonte: elaborado pela autora.

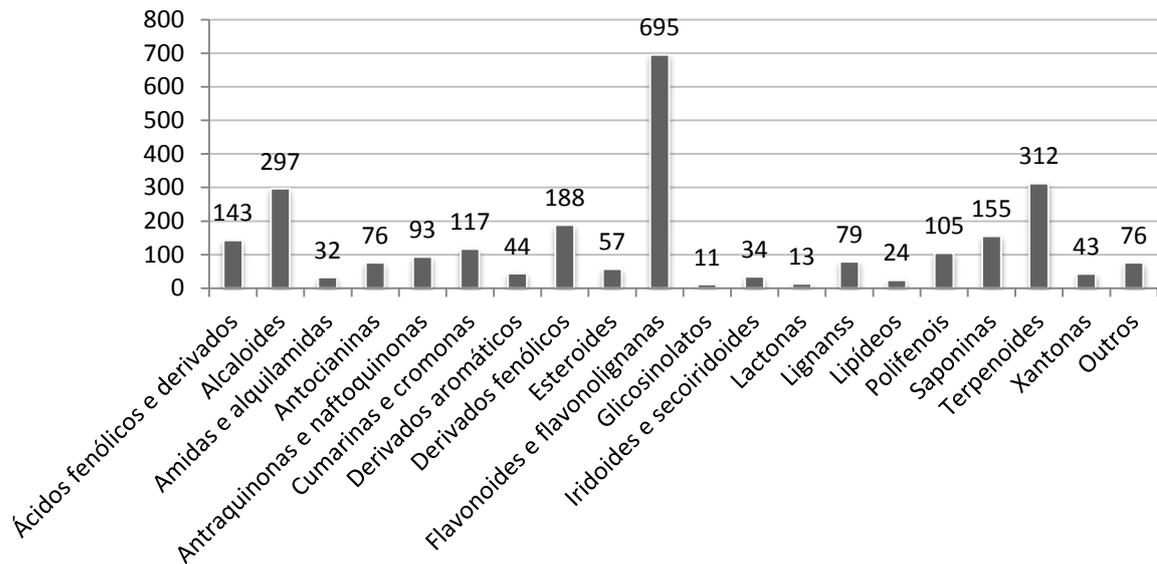
Entre os artigos de aplicação, em apenas 22 (8,63%) foram realizados estudos somente em escala analítica. A facilidade de desenvolvimento de métodos em escalas semipreparativa e preparativa é um diferencial da CCC, tornando-a muito atrativa para as áreas que visam à obtenção de maiores quantidades de compostos purificados.

### 8.1 SEPARAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A purificação de produtos de origem natural é um processo complexo em que, por vezes, são necessárias técnicas de separação muito variadas. A CCC se destaca de outros métodos de separação devido, principalmente, às vantagens associadas à ausência de um suporte sólido, com o custo reduzido e a possibilidade de 100% de recuperação da amostra, já que não haverá perda por adsorção ao suporte. Associado a esta característica, os equipamentos atuais permitem o fácil escalonamento, com custos e tempos similares ao de outras técnicas, sendo que alguns exemplos partem de experimentos analíticos operando na faixa de miligramas para separações de amostra da ordem de quilogramas (SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2015).

Além disso, compostos com uma ampla diversidade de polaridade podem ser purificados. Esta versatilidade é possível pois há inúmeros sistemas solventes capazes de serem utilizados para composição das fases estacionária e móvel, que podem ser ajustadas de acordo com a polaridade desejada. Em trabalho de revisão que contemplou estudos em CCC e CPC publicados entre 1984 e 2014, Skalincka-Woźniak e Garrard (2015) contabilizaram um total de 2594 compostos separados por CCC (Figura 14).

Figura 14 – Classes dos compostos naturais separados por CCC



Fonte: adaptado de Skalincka-Woźniak e Garrard (2015).

Flavonoides e flavonolignanas são a classe mais popular em separações por CCC, com 695 compostos. Com cerca de metade desse valor, terpenoides e alcaloides aparecem em segundo e terceiro lugar, respectivamente. Esta diferença sugere que talvez a CCC esteja mais adaptada para determinados produtos naturais, particularmente flavonoides e flavolignanas.

Costa e Leitão (2010) revisaram e propuseram estratégias para o isolamento de flavonoides livres e glicosilados por CCC. Por exemplo, a adição de butanol a uma proporção de SSB da família HEMWat é capaz de otimizar o particionamento de solutos polares, como os flavonoides glicosilados e alguns flavonoides livres, pois age como modificador da fase orgânica. Ou então, sugerem o uso de SSBs compostos por acetato de etila, butanol e água, em que é possível aplicar um gradiente de polaridade pela alteração da proporção de butanol, o que teria grande impacto na polaridade da fase orgânica, e menor impacto na fase aquosa.

Jiang e colaboradores (2015) isolaram cinco flavonoides empregando dois SSBs diferentes, em duas separações consecutivas por HSCCC. O extrato bruto de grãos de *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn foi inicialmente submetido a uma separação com SSB de HEMWat (3:5:3:5, v/v/v/v), resultando no isolamento de dois flavonoides e coeluição dos outros três. A fração contendo os três compostos coeluídos foi posteriormente separada com SSB mais polar, composto por acetato de etila/n-butanol/água (7:3:10, v/v/v). Todos os compostos foram isolados com purezas superiores a 96%.

Em relação aos terpenoides, (SONG et al., 2016) apontam que a baixa polaridade e a ausência de absorção UV dificultam o isolamento por tecnologias de separação comuns, e portanto a CCC acoplada a detectores ELS tem se mostrado adequada para a separação destes

compostos. Já o isolamento e purificação de alcaloides, devido à natureza alcalina das moléculas, apresentam bons resultados principalmente em CCC com refinamento por zona de pH, em que SSBs contendo solventes clorados, alcanos ou éter metil-*terc*-butílico se destacam (FANG et al., 2011).

Skalincka-Woźniak e Garrard (2015), em sua revisão, também avaliaram todos os SSBs utilizados para as separações dos produtos naturais. A Tabela 3 apresenta alguns dos sistemas isocráticos utilizados para a separação das oito classes mais populares de produtos naturais. Os SSBs foram divididos em grupos hierárquicos baseados no solvente primário da fase hidrofóbica. Para a maioria das classes, os SSB mais empregados são aqueles baseados em alcanos, como a família HEMWat. A exceção é a classe das saponinas, em que os sistemas clorados são os mais utilizados, seguidos de outros SSBs, especialmente sistemas baseados em álcoois imiscíveis em água, como álcool butílico (SONG et al., 2016).

Tabela 3 – Perfil quantitativo de compostos naturais purificados de acordo com sua classe e o tipo de SSB empregado.

	Alcanos	Clorados	Éteres	Outros
Flavonoides e flavonolignanas	279	97	67	191
Alcaloides	105	76	79	27
Terpenoides	210	24	28	8
Derivados fenólicos	59	22	17	61
Ácidos fenólicos e derivados	64	18	23	30
Saponinas	31	52	5	41
Polifenóis	82	0	4	18
Cumarinas e cromonas	51	8	19	12

Fonte: Skalincka-Woźniak e Garrard (2015).

De acordo com Friesen e colaboradores (2015), a CCC tem sido empregada principalmente como uma etapa de um processo mais complexo de fracionamento de produtos naturais do que como único procedimento de separação. Em um fluxo de separação, a possibilidade de trabalhar com grandes volumes de amostra bruta, minimizando tratamentos prévios e etapas de filtração e evaporação de solventes, por exemplo, pode ser vantajosa em termos econômicos e de eficiência (FRIESEN et al., 2015). Ainda, a variedade de solventes que pode ser utilizada em CCC possibilita o acoplamento a outras técnicas de cromatografia líquida.

Outra aplicação da CCC é para o que tem sido chamado de “nocaute” de compostos majoritários, principalmente na avaliação da contribuição biológica de um metabólito para a atividade global de um extrato natural. Quando se deseja isolar os compostos minoritários,

que estão presentes em níveis muito baixos e às vezes até indetectáveis por CLAE, é mais efetivo remover previamente os componentes principais. Desta forma, há o enriquecimento dos compostos menores, possibilitando o seu isolamento e identificação estrutural (ZHAO et al., 2015). Este enriquecimento também pode ser alcançado adicionando uma fração de metabólitos minoritários previamente separada para um extrato original que não foi modificado, sendo esta abordagem chamada de DESIGNER (do inglês *Depletion and Enrichment of Select Ingredients Generating Normalized Extract Resources*) (ALVARENGA et al., 2014).

## 8.2 ENANTIOSSEPARAÇÃO

De forma similar a outras técnicas para separação de enantiômeros, como eletroforese capilar e, principalmente CLAE, em CCC é necessário utilizar um seletor quiral (SQ), que é adicionado ao sistema solvente. Idealmente, o SQ é uma molécula com alta enantiosseletividade em relação ao racemato alvo, solúvel em apenas uma das fases do SSB. Geralmente esta é a fase que será utilizada como estacionária, pois assim a quantidade requerida de seletor quiral é menor (MINGUILLÓN, 2012). Os principais SQs utilizados são derivados de ciclodextrinas (CDs), em especial de  $\beta$ -CDs, pois apresentam, para muitas estruturas, boa estereosseletividade e habilidade de reconhecimento quiral (HUANG; DI, 2015).

No entanto, dificilmente são conseguidos fatores de separação ( $\alpha$ ) maiores que 1,5 (HAN et al., 2014), devido à ausência de SQ altamente enantiosseletivos para os racematos alvo, e pela menor eficiência relacionada à técnica. Huang e Di (2015) afirmam que essa desvantagem inibe o desenvolvimento e as aplicações da separação quiral por CCC, que tem evoluído mais lentamente que a enantiosseparação por outros métodos.

Métodos em CLAE têm importante papel na separação de compostos quirais, mas em muitos casos são empregadas colunas enantiosseletivas. A ligação do SQ ao suporte sólido é de alto custo e complexidade (HAN et al., 2014), limitando a aplicação destes métodos. Em CCC, o custo torna-se menor, uma vez que o SQ é adicionado ao SSB, e pode ser recuperado no final da corrida.

Tong, Zhen, e Yan (2013) avaliaram a enantiosseparação, em escala preparativa, de ácido 2-fenilpropiónico por CLAE e HSCCC com reciclagem, adicionando o mesmo SQ nas fases móveis de ambos os métodos. Mesmo sem o uso de uma coluna com suporte quiral, a coluna preparativa utilizada para a separação por CLAE também representa um custo elevado

no desenvolvimento metodológico. Ainda, a técnica requer reagentes com grau de pureza cromatográfico, enquanto em HSCCC podem ser utilizados reagentes de grau analítico, diminuindo o custo total da técnica (Tabela 4). Dessa forma, a utilização da CCC em escala preparativa é apontada como atrativa para a separação de compostos quirais.

A eluição com reciclagem, aplicada por Tong, Zhen e Yan (2013), é uma forma de aumentar a resolução dos enantiômeros, sem recorrer a um consumo extra de solvente tampouco de SQ. Outras estratégias para otimizar a separação de enantiômeros são apresentadas na Tabela 5, que lista alguns dos principais artigos de CCC quiral publicados entre 2013 e 2016.

Tabela 4 – Comparação entre a enantioseparação em escala preparativa de ácido 2-fenilpropiónico por CLAE e HSCCC.

	CLAE	HSCCC com reciclagem
Quantidade de amostra (mg)	40	40
Tempo de corrida (min)	75	650
Resolução	0,63	1,15
Recuperação (%)	66 – 85	85 – 93
Pureza (%)	88 – 95	95 – 98
Quantidade total de solventes (mL)	300 (grau cromatográfico)	820 (grau analítico)
Quantidade total de SQ (mmol)	7,5	52,0

Fonte: Tong, Zhen, e Yan (2013).

É possível também recorrer ao reconhecimento quiral bifásico, o qual consiste na adição de dois SQs no SSB, um lipofílico e outro hidrofílico, com o objetivo de aumentar a enantiosseletividade. Além da solubilidade adequada nas fases do sistema, é preciso que o reconhecimento quiral para um dado enantiômero seja oposto para cada SQ. Alguns estudos em que foi empregada esta estratégia utilizaram, por exemplo, derivados de tartarato e de  $\beta$ -CD como SQs lipofílicos e hidrofílicos, respectivamente (SUN et al., 2014). A maior vantagem é o aumento da pureza de cada enantiômero obtido, sem aumento do tempo de corrida e do consumo de solventes (HUANG; DI, 2015).

A formação de complexos entre íons metálicos e seletores quirais é uma estratégia que pode ser utilizada em CCC para a enantioseparação de compostos que possuem grupos de caráter eletronegativo em sua estrutura, como aminas, carbonilas e hidroxilas. As ligações de coordenação que ocorrem entre complexos com íon metálico são mais estereosseletivas que as outras forças intermoleculares (ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações dipolo-dipolo) (TONG et al., 2014). Assim, o poder de reconhecimento quiral é aumentado, o que pode levar à separação de maior resolução e pureza (HUANG; DI, 2015).

A CCC quiral está no início de seu desenvolvimento, e ainda são necessárias melhorias na eficiência de separação. Huang, e Di (2015), trazem os principais aspectos a serem desenvolvidos: seletores quirais com melhor seletividade; otimização dos sistemas solventes para que não interfiram no reconhecimento do SQ; novos designs de instrumentos que permitam melhor retenção de fase estacionária e novos métodos para aumentar a resolução.

Tabela 5. Principais estudos de enantioseparação por CCC publicados entre 2013 e 2016.

Racemato alvo	SQs	SSB	Metodologia	Referência
Derivados de ácido 2-fenil-propanoico	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/AEt/sol. aq. de tampão fosfato	Modo reverso isocrático	Tong et al., 2016
Bronfeniramina	Carboximetil- $\beta$ -CD	N-hex/acetato de isobutila/sol. aq. de tampão fosfato	Reciclagem	Zhang et al., 2016
Derivados de ácido 2-fenilpropiónico	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/AEt/ sol. aq. de tampão fosfato	Modo reverso isocrático	Tong, Zhang e Cheng, 2015
Ácidos $\alpha$ -hidroxil-carboxílicos aromáticos	Complexo Cu <sub>2</sub> - $\beta$ -CD	N-hex/AEt/sol. aq. de tampão fosfato	Complexo com íon metálico	Han et al., 2015
Ácido fenilsuccínico	D-tartarato de isobutila e hidroxipropil- $\beta$ -CD	N-hex/éter metil- <i>terc</i> -butílico/água	Reconhecimento quiral bifásico	Sun et al., 2014
Trans- $\delta$ -viniferina	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/AEt/água	Modo reverso isocrático	Han et al., 2014
Oxibutinina	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/éter metil- <i>terc</i> -butílico/sol. aq. de tampão fosfato	Reciclagem	Zhang et al., 2014
Ácidos $\alpha$ -hidroxil aromáticos	Complexo Cu-(N-n-dodecil-L-prolina) <sub>2</sub>	Butanol/água e N-hex/butanol/água	Complexo com íon metálico	Tong et al., 2014
Triptofano	Albumina de soro bovino	PEG 8000/fosfato de potássio dibásico/amônia/água	Modo normal isocrático	Tong, Ito e Ma, 2014
Propafenona	Di-n-butil L-tartarato e ácido bórico	Clorofórmio/sol. aq. de tampão acetato	Reconhecimento quiral bifásico	Tong et al., 2013
Ácido 2-fenil-propiónico	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/AEt/sol. aq. de tampão fosfato	Reciclagem	Tong, Zheng e Yan, 2013a
Ácidos aromáticos	Hidroxiopropil- $\beta$ -CD	N-hex/AEt/sol. aq. de tampão fosfato	Eluição em modo duplo múltiplo	Tong, Zheng e Yan, 2013b

N-hex: n-hexano; AEt: acetato de etila; sol. aq.: solução aquosa.

Fonte: elaborado pela autora.

### 8.3 OUTRAS APLICAÇÕES

Além da separação de compostos naturais e enantiômeros, existem diversas outras aplicações da CCC encontradas na literatura, embora menos frequentes, como por exemplo, a identificação de impurezas e a purificação de compostos inorgânicos e fármacos sintéticos (BERTHOD; RUIZ-ÁNGEL; CARDA-BROCH, 2009). Entre os produtos com atividade biológica, a maioria é de origem vegetal, mas há também exemplos recentes em preparações biotecnológicas provenientes de algas (HAMMANN et al., 2013), fungos (LU et al., 2014) e bactérias (HE et al., 2013).

Algumas proteínas obtidas de plantas, animais ou microorganismos têm sido alvo de separações por CCC, para aplicação na indústria alimentícia ou farmacêutica. He e colaboradores (2016) purificaram  $\alpha$ -glicosidase extraída de intestinos de ratos por HSCCC com extrusão. Foram utilizadas micelas reversas formadas por surfactante aniônico em isooctano como fase móvel, e tampão Tris-HCl como fase estacionária. Devido à presença de surfactante no SSB, a velocidade de rotação empregada foi 700 rpm, para não haver emulsificação. A atividade catalítica das frações purificadas aumentou em relação ao extrato enzimático bruto, indicando que a purificação de proteínas por CCC oferece além das vantagens inerentes à técnica, a manutenção da atividade biológica, devido à versatilidade dos solventes que podem ser empregados.

Na área de impurezas, Li e colaboradores (2014) compararam os perfis de impurezas de preparações farmacêuticas obtidos por CCC e CLAE em escala preparativa. Foram desenvolvidos métodos com gradiente de polaridade para a separação por HPCCC e CLAE de seis produtos de degradação de uma preparação de honokiol submetida a teste de estabilidade. Ambas as técnicas tiveram o tempo de corrida de 90 min, com resultados de pureza e recuperação dos compostos similares. No entanto, o método desenvolvido por HPCCC apresentou vantagens relacionadas à maior carga de amostra e menor consumo de solvente, indicando a melhor eficiência da técnica, quando comparada à CLAE preparativa.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A CCC está estabelecida como uma técnica de separação preparativa, e apesar do seu surgimento e aprimoramento na década de 1970, a CCC segue em evolução contínua, sendo que uma parcela dos artigos publicados na área é referente ao desenvolvimento de novos métodos ou novos instrumentos. É notável que a maioria das inovações esteja relacionada à natureza líquida de ambas as fases cromatográficas, como o refinamento por zona de pH e outras otimizações do modo de eluição.

As vantagens inerentes da técnica, como a possibilidade de injeção direta de extratos brutos, tornam a CCC uma alternativa para contornar os problemas associados com adsorção na fase sólida. Além disto, a relação custo-eficiência da CCC tem se mostrado promissora, principalmente em comparação com métodos equivalentes desenvolvidos em CLAE.

A separação de compostos para avaliação de seu potencial terapêutico ou toxicológico, é um dos principais propósitos dos estudos em CCC, que vai de encontro aos interesses da indústria farmacêutica e farmoquímica. A obtenção de quantidades significativas dos produtos isolados, mesmo que presentes em concentrações baixas na mistura inicial, é um desafio para as técnicas de separação já consagradas, onde a CCC é vista como vantajosa.

Os processos de separação por CCC podem ser muito flexíveis, pois outras modificações podem ser aplicadas além dos parâmetros ajustáveis usuais de outras técnicas de cromatografia líquida. Algumas das estratégias mais singulares praticadas em CCC são a troca do modo de operação pelo intercâmbio entre as fases, a extrusão da fase estacionária, e o refinamento por zona de pH, pela adição de modificadores em ambas as fases do sistema.

Diante de tantas opções, os pesquisadores devem adotar uma abordagem lógica para desenvolvimento de novos processos de separação. Os avanços relativos à determinação do SSB, em especial os modelos preditivos, são fundamentais para a praticidade de utilização da técnica, e a difusão do seu uso em outros campos de pesquisa.

## 10 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, R. F. R. et al. K<sup>-</sup>-Targeted Metabolomic Analysis Extends Chemical Subtraction to DESIGNER Extracts: Selective Depletion of Extracts of Hops (*Humulus lupulus*). **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 12, p. 2595–2604, 26 dez. 2014.
- BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Use of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 168–177, 2004.
- BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M. J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 2, p. 327–340, 2005.
- BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M. J.; CARDA-BROCH, S. Countercurrent chromatography: People and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4206–4217, 2009.
- BEZOLD, F.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 126–132, 2015.
- COSTA, F. DAS N. et al. Solvent system selectivities in countercurrent chromatography using *Salicornia gaudichaudiana* metabolites as practical example with off-line electrospray mass-spectrometry injection profiling. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 20–27, mar. 2015.
- COSTA, F. DAS N.; LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 3, p. 336–347, fev. 2010.
- DUANMU, Q. et al. Semi-preparative high-speed counter-current chromatography separation of alkaloids from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn by pH-gradient elution. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 12, p. 1746–1751, 2010.
- ENGLERT, M.; HAMMANN, S.; VETTER, W. Isolation of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and lutein from carrots by countercurrent chromatography with the solvent system modifier benzotrifluoride. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 119–125, 2015.
- ENGLERT, M.; VETTER, W. Tubing modifications for countercurrent chromatography (CCC): Stationary phase retention and separation efficiency. **Analytica Chimica Acta**, v. 884, p. 114–123, 2015a.
- ENGLERT, M.; VETTER, W. Overcoming the equivalent-chain-length rule with pH-zone-refining countercurrent chromatography for the preparative separation of fatty acids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 18, p. 5503–5511, 2015b.
- FANG, L. et al. Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 19, p. 2545–2558, 2011.
- FREIRE, M. G. et al. Insight into the Interactions That Control the Phase Behaviour of New Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol Polymers and Ionic Liquids.

**Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 6, p. 1831–1839, 6 fev. 2012.

FREY, A.; HOPMANN, E.; MINCEVA, M. Selection of biphasic liquid systems in liquid-liquid chromatography using predictive thermodynamic models. **Chemical Engineering and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1663–1674, 2014.

FRIESEN, J. B. et al. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 2015.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems in CCC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 17, p. 2777–2806, 2005.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 51–59, 2007.

GARRARD, I. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 12–13, p. 1923–1935, 2005.

GUZLEK, H.; WOOD, P. L.; JANAWAY, L. Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4181–4186, 2009.

HAMMANN, S. et al. Profiling the fatty acids from a strain of the microalgae *Alexandrium tamarense* by means of high-speed counter-current chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1312, p. 93–103, 2013.

HAMMANN, S.; CONRAD, J.; VETTER, W. Fractionation of technical octabromodiphenyl ether by countercurrent chromatography combined with gas chromatography/mass spectrometry and offline and online  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of chromatography. A**, v. 1398, p. 83–93, 2015.

HAN, C. et al. Enantioseparation of racemic *trans*- $\delta$ -viniferin using high speed counter-current chromatography based on induced circular dichroism technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1324, p. 164–170, 2014.

HAN, C. et al. Enantioseparation of aromatic  $\alpha$ -hydroxycarboxylic acids: The application of a dinuclear  $\text{Cu}_2(\text{II})$ - $\beta$ -cyclodextrin complex as a chiral selector in high speed counter-current chromatography compared with native  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Chromatography A**, v. 1375, p. 82–91, 2015.

HE, K. et al. Purification of  $\alpha$ -glucosidase from mouse intestine by countercurrent chromatography coupled with a reverse micelle solvent system. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 4, p. 703–708, 2016.

HE, S. et al. Preparative isolation and purification of macrolactin antibiotics from marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 15–19, 2013.

HU, R.; PAN, Y. Recent trends in counter-current chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 40, p. 15–27, 2012.

HUANG, X.-Y.; DI, D.-L. Chiral separation by counter-current chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 128–133, 2015.

HUANG, X. Y. et al. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214–225, 2016.

IGNATOVA, S. et al. Gradient elution in counter-current chromatography: A new layout for an old path. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6053–6060, 2011.

ITO, Y. Countercurrent chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 1981.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 145–168, 2005a.

ITO, Y. Origin and Evolution of the Coil Planet Centrifuge: A Personal Reflection of My 40 Years of CCC Research and Development. **Separation & Purification Reviews**, v. 34, n. 2, p. 131–154, 2005b.

ITO, Y. pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 71–85, 2013.

ITO, Y. Counter-current motion in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 128–132, 2014.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support. **Science**, v. 167, n. 3916, p. 281–283, 16 jan. 1970.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Horizontal flow-through coil planet centrifuge without rotating seals. **Analytical Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 63–68, 1977.

ITO, Y.; SANDLIN, J.; BOWERS, W. G. High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. **Journal of Chromatography A**, v. 244, n. 2, p. 247–258, 1982.

JIANG, S. et al. Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off-line two dimensional high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 186, p. 153–159, 2015.

KO, J. et al. Separation of five oligostilbenes from *Vitis amurensis* by flow-rate gradient high-performance counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 24, p. 3860–3865, 2013.

KOSTANYAN, A. E. Simple equations to simulate closed-loop recycling liquid-liquid chromatography: Ideal and non-ideal recycling models. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 71–78, 2015.

LEITÃO, G.; COSTA, F. Gradient Elution in Countercurrent Chromatography. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1592–1596, 21 set. 2015.

LI, S. et al. Comparison of counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography applied to separating minor impurities in drug preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 1344, p. 51–58, 2014.

LI, W.; WU, T. Rapid separation of polysaccharides using a novel spiral coil column by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 8, p. 1404–1410, 2016.

LIU, Q. et al. Separation of polyphenols from leaves of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder by off-line two-dimensional High Speed Counter-Current Chromatography combined with recycling elution mode. **Food Chemistry**, v. 186, p. 139–145, 2015a.

LIU, Y. et al. Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1582–1591, 2015b.

LIU, Y. et al. Three-phase solvent systems for the comprehensive separation of a wide variety of compounds from *Dicranostigma leptopodum* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, p. 2038–2045, jun. 2015c.

LU, R. et al. New tyrosinase inhibitors from *paecilomyces gunnii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 49, p. 11917–11923, 2014.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 181–194, 2006.

MICHEL, T.; DESTANDAU, E.; ELFAKIR, C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: Focus on coupling strategy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 4, p. 957–969, 2014.

MINGUILLÓN, C. Countercurrent chromatography, scope and perspectives: Application to chirotechnology. **Chemical Engineering and Technology**, v. 35, n. 1, p. 35–45, 2012.

PAEK, J. H.; LIM, S. S. Preparative isolation of aldose reductase inhibitory compounds from *Nardostachys chinensis* by elution–extrusion counter-current chromatography. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 10, p. 1271–1279, 2014.

REN, D. et al. Computation-aided separation of seven components from *Spirodela polyrrhiza* (L.) via counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 160–165, 2016.

REN, D. B. et al. Correlation and prediction of partition coefficient using nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for solvent system selection in counter-current chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1301, p. 10–18, 2013.

REN, D. B. et al. Systematic and practical solvent system selection strategy based on the nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for real-life counter-current

chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1393, p. 47–56, 2015.

RUBIO, N. et al. Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (*S*)-naproxen derivative as chiral selector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 48, p. 8505–8511, 2009.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. A comprehensive classification of solvent systems used for natural product purifications in countercurrent and centrifugal partition chromatography. **Natural product reports**, v. 32, n. 11, p. 1556–61, 2015.

SONG, H. et al. Developments in high-speed countercurrent chromatography and its applications in the separation of terpenoids and saponins. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 8, p. 1574–1591, 2016.

SUMNER, N. Developing counter current chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6107–6113, 2011.

SUN, G. et al. Separation of phenylsuccinic acid enantiomers using biphasic chiral recognition high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 14, p. 1736–1741, 2014.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 6–13, 2007.

SUTHERLAND, I. A.; FISHER, D. Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 4, p. 740–753, 2009.

TONG, S. et al. Enantiomeric separation of (*R, S*)-naproxen by recycling high speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 32, p. 5434–5440, 2011.

TONG, S. et al. Preparative enantioseparation of propafenone by counter-current chromatography using di-*n*-butyl L-tartrate combined with boric acid as the chiral selector. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 3101–3106, 2013.

TONG, S. et al. Chiral ligand exchange high-speed countercurrent chromatography: Mechanism and application in enantioseparation of aromatic  $\alpha$ -hydroxyl acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 110–118, 2014.

TONG, S. et al. Enantioseparation of 2-(substituted phenyl)propanoic acids by high-speed countercurrent chromatography and investigation of the influence of substituents in enantioselectivity. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 8, p. 1567–1573, abr. 2016.

TONG, S.; ITO, Y.; MA, Y. Enantioseparation of DL-tryptophan by spiral tube assembly counter-current chromatography and evaluation of mass transfer rate for enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 77–84, 2014.

TONG, S.; ZHANG, H.; CHENG, D. Preparative Enantioseparation of  $\beta$ -Substituted-2-Phenylpropionic Acids by Countercurrent Chromatography With Substituted  $\beta$ -Cyclodextrin

as Chiral Selectors. **Chirality**, v. 27, n. 11, p. 795–801, nov. 2015.

TONG, S.; ZHENG, Y.; YAN, J. Application and comparison of high performance liquid chromatography and high speed counter-current chromatography in enantioseparation of ( $\pm$ )-2-phenylpropionic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 79–86, 2013a.

TONG, S.; ZHENG, Y.; YAN, J. Enantioseparation of chiral aromatic acids by multiple dual mode counter-current chromatography using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 12, p. 2035–2042, 2013b.

WOOD, P. et al. Counter-current chromatography separation scaled up from an analytical column to a production column. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 25–30, 2007.

WU, D.; CAO, X.; WU, S. Overlapping elution-extrusion counter-current chromatography: A novel method for efficient purification of natural cytotoxic andrographolides from *Andrographis paniculata*. **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 53–63, 2012.

WU, X. et al. Separation of chemical constituents from three plant medicines by counter-current chromatography using a three-phase solvent system at a novel ratio. **Journal of Chromatography A**, v. 1384, p. 107–114, 2015.

YANAGIDA, A. et al. Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 74–81, 2007.

YANG, Z. et al. Novel linear and step-gradient counter-current chromatography for bio-guided isolation and purification of cytotoxic podophyllotoxins from *Dyosma versipellis* (Hance). **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 6, p. 1022–1028, 2013.

YIN, H. et al. The separation of flavonoids from *Pongamia pinnata* using combination columns in high-speed counter-current chromatography with a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, v. 1315, p. 80–85, 2013.

YOON, K. D.; CHIN, Y.-W.; KIM, J. Centrifugal Partition Chromatography: Application To Natural Products in 1994-2009. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 33, n. 9–12, p. 1208–1254, 2010.

ZHANG, M. et al. Cost-efficient and process-efficient separation of geniposide from *Gardenia jasminoides* Ellis by high-performance counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 193–198, 2012.

ZHANG, P. et al. Enantiomeric separation of oxybutynin by recycling high-speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector. p. 3443–3450, 2014.

ZHANG, P. et al. Chiral separation of brompheniramine enantiomers by recycling high-speed countercurrent chromatography using carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 12, p. 2300–2306, jun. 2016.

ZHAO, H. et al. Analysis and improved characterization of minor antioxidants from leaves of *Malus doumeri* using a combination of major constituents' knockout with high-performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time-of-flight tandem mass spectromet. **Journal of Chromatography A**, v. 1398, p. 57–65, 2015.

ZHOU, X. Y. et al. Aqueous biphasic system based on low-molecular-weight polyethylene glycol for one-step separation of crude polysaccharides from *Pericarpium granati* using high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 129–134, 2014.