

Separação sequencial de piperonal por cromatografia líquida de alta eficiência

A. M. RAMOS¹, M. A. CREMASCO²

¹Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia de Itacoatiara,
Email para contato: alexmartins@ufam.edu.br

²Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de
Engenharia de Processos

RESUMO: Separações cromatográficas são importantes no fim de processos que se utilizam de rotas químicas, visando a recuperação e o aumento da pureza do produto de interesse. O piperonal, obtido por síntese, apresenta pureza cerca de 85 %. Devido à sua relevância para a indústria de cosméticos é necessário purificar cada vez maiores. O objetivo deste trabalho é o de separar o piperonal em escala semipreparativa em batelada. Fizeram-se injeções em escala analítica para obter os parâmetros seletividade e resolução. Com tais parâmetros, foram obtidos o tempo de ciclo de cada injeção, o tempo de coleta e a concentração da solução de alimentação. O sistema de separação consistiu de uma coluna analítica e uma semipreparativa preenchidas com fase estacionária C₁₈, tendo como fase móvel etanol/água, na proporção 70/30 (v/v) à 35°C. Com a cromatografia semipreparativa sequencial foi possível obter o piperonal com pureza elevada, na ordem de 99 %.

1. INTRODUÇÃO

O piperonal tem elevada importância na indústria de fragrância como fixador, além de ser substrato para síntese de produtos de interesse farmacêutico. Entre essas substâncias, está a piperina que é usada como anti-inflamatório; vanilina utilizada como antioxidante; piperidil e a L-DOPA utilizados como agentes anti-Parkinson; eupaverina usada como vaso dilatador; papaverina usada para tratamento da disfunção erétil (Santos *et al.*, 2004).

Questões ambientais e o alto custo das rotas sintéticas tradicionalmente utilizadas para obtenção de piperonal impulsionaram o desenvolvimento de novos processos de síntese (Blair e Hill, 1959; Farinacci, 1957; Torri *et al.*, 1984). Uma alternativa às rotas tradicionais foi empregada por Braga (2007) e levou a um rendimento em torno de 85 % de piperonal. Ressalte-se que a estratégia de Braga (2007) foi aplicada diretamente na amostra de óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC), rica em safrol. A solução resultante apresentou não apenas a molécula-alvo, mas também outras substâncias como terpinoleno (presente no óleo), safrol, *cis,trans*-isosaflol e isosaflol glicol.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) possui vários modos de operação, como reciclo no estado estacionário e injeção empilhada. Isso possibilita o aumento da

quantidade injetada, independentemente do número de componentes presentes na mistura. Estudos em purificação de produtos em mistura multicomponente mostraram que a cromatografia semipreparativa em fase reversa (RP-HPLC) apresenta a maior eficiência e pureza, mesmo em quantidades elevadas (Waksmundazka-Hajnos e Sherma, 2011; Schuur *et al.* 2011; Do *et al.* 2014).

Assim sendo, o objetivo desse trabalho é o de separar o piperonal de uma solução de síntese a partir do óleo essencial de pimenta longa por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa por injeção sequencial.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e Reagentes

O sistema analítico consistiu de cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto por uma bomba LC-20AT, com injetor manual (Rheodyne, Modelo 7725i, Califórnia) com alça de amostragem de 20 e 800 μ L, detector ultravioleta SPD-20A. Todas essas unidades estão interligadas através de uma interface CMB-20A e operados por computador, por meio do qual os cromatogramas foram registrados pelo *software LC Solution*. Para a obtenção da curva de calibração bem como da solução de trabalho foram utilizados os padrões de safrol (97%, Sigma, USA) e piperonal (99%, Sigma, USA). As colunas utilizadas nos modos analítico (25 x 0,46 cm) e semipreparativo (25 x 1,0 cm) foram preenchidas com sílica recoberta com octadesilsilano (C_{18} , VYDAC 150HC, USA) polimerizada, cujo tamanho de partícula é de 20 μ m. Os solventes que constituíram a fase móvel foram etanol (J. T. Baker, grau HPLC, Brasil) e água ultrapura (Millipore, Direct-Q3, Brasil), na proporção 70/30(v/v). Para as determinações de tempo morto, utilizou-se uracil (98%, Sigma, USA). Todos os solventes foram filtrados à vácuo em membrana PTFE modificado, de 0,45 μ m de porosidade e degaseificados em banho de ultrassom (8892R-MT, Cole-Parmer, USA).

2.2 Método

2.2.1 Separação em escala analítica

A solução de trabalho foi preparada com base na composição porcentual massa/massa encontrada em Braga (2007) para os componentes de maior concentração na solução de síntese, a partir do óleo essencial de pimenta longa, sendo 85 % de piperonal, 1,70 % de safrol, 7,58 % de isosafrol e 0,90 % de terpinoleno. Neste trabalho, os valores referentes ao safrol e isosafrol foram somados e o terpinoleno não fez parte da mistura devido a sua concentração ser pequena em relação à concentração do piperonal. Em seguida, preparou-se uma solução de 1,0 g/L de piperonal/safrol, na proporção porcentual de 85:10 em fase móvel etanol/água. Os valores de seletividade (α), resolução (R_s) e número de pratos teóricos foram calculados como em Collins (2006).

2.2.2 Separação em escala semipreparativa

Para que os parâmetros cromatográficos analíticos sejam reprodutíveis em escala semipreparativa, é aconselhável manter altura e a velocidade superficial constantes e variar o raio (r) da coluna e quantidade injetada (m_{inj}) da amostra, conforme as Equações (2.1) e (2.2):

$$\frac{Q_1}{A_1} = \frac{Q_2}{A_2} \Rightarrow \frac{Q_1}{\pi r_1^2} = \frac{Q_2}{\pi r_2^2} \Rightarrow \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^2 = \frac{Q_2}{Q_1} \quad (2.1)$$

$$\frac{m_{inj2}}{m_{inj1}} = \frac{V_2}{V_1} \Rightarrow \frac{m_{inj2}}{m_{inj1}} = \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^2 \quad (2.2)$$

em que Q , A , V são a vazão, a área da seção transversal e o volume das colunas nos modos analítico (1) e semipreparativo (2). A partir dos cálculos e das informações obtidas no item 2.2.1, foram preparadas cinco soluções cujas concentrações variaram de 0,3 a 10,0 g/L, na composição porcentual de piperonal/safrol de 85:10 em fase móvel etanol/água.

2.2.3 Tempo de ciclo e parâmetros de desempenho

De posse do cromatograma representado na Figura 1, obteve-se o tempo de ciclo (t_c) e o tempo de coleta (t_A) das frações ricas em piperonal e safrol, como segue: marcou-se o tempo inicial (t_i) na linha de base, antes de começar a surgir o sinal do primeiro componente; o tempo final (t_f), por sua vez, foi obtido após o sinal do último componente atingir a linha de base. A diferença entre t_f e t_i é o tempo de ciclo. O tempo de coleta (t_A) da fração de interesse começa no tempo inicial e vai até o tempo em que o sinal do componente coletado aproxima-se da linha de base, evitando-se coletar próximo ao surgimento do sinal do próximo componente para não ocorrer contaminações. Os parâmetros de desempenho pureza, recuperação e produção foram calculados conforme descritos em Guiochon *et al.* (2006).

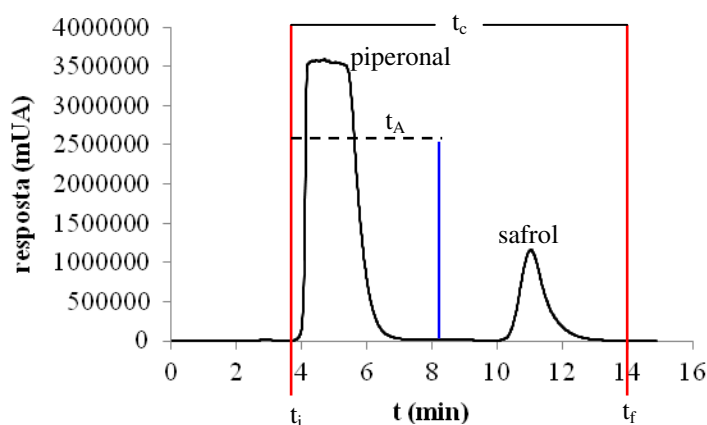


Figura 1. Obtenção do tempo de ciclo (t_c) e do tempo de coleta (t_A). Condições experimentais: $Q = 3,00$ mL/min, $T = 35,0$ °C, Pressão = 47 kgf/cm²; $V_{injeção} = 800$ µL; Coluna = $25 \times 1,0$ cm; $C = 10,0$ g/L (85% de piperonal + 10% safrol).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Separação em escala analítica

Os resultados apresentados na Figura 2 representam o cromatograma dos componentes majoritários presentes na solução de síntese do piperonal. Nota-se que o sistema cromatográfico empregado não distingue entre o safrol e o isosafrol, pois os mesmos coeluem. Isso se deve ao fato de estas substâncias serem isômeros constitucionais e apresentarem estruturas muito parecidas, diminuindo a capacidade de discriminação da fase estacionária (Solomons e Fryhle, 2012). Em relação ao objetivo deste trabalho, isso é uma vantagem, uma vez que o produto de interesse é o piperonal, pois o safrol e o isosafrol são vistos como um só componente. Como a concentração do terpinoleno é extremamente pequena em relação à do piperonal, a solução pode ser tratada como uma mistura pseudo-binária. Essa abordagem facilita a produção do piperonal em escala semipreparativa.

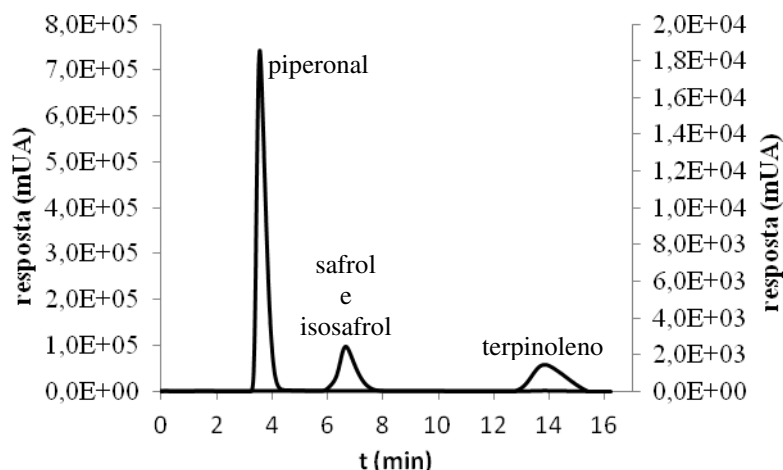


Figura 2. Mistura multicomponente. Condições experimentais: $Q = 1,00 \text{ mL/min}$; $T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Pressão = 133 kgf/cm^2 ; $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; Detecção UV = 245 nm ; fase móvel = etanol/água-70/30 (v/v); fase estacionária = C_{18} ; Coluna = $25 \times 0,46 \text{ cm}$; C: $1,0 \text{ g/L}$ (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno).

Dessa maneira, realizou-se uma análise em coluna analítica para obtenção dos parâmetros de ampliação de escala para a coluna semipreparativa, conforme mostra a Figura 3. Para manter as mesmas condições de seletividade (α) e resolução (R_s), a vazão obtida foi $4,756 \text{ mL/min}$ e a concentração de $0,30 \text{ g/L}$ (Equações 1 e 2). Por outro lado, a quantidade de massa injetada seria muito pequena. Para aumentar essa massa, mediante o uso de soluções mais concentradas sem que ocorra perda na pureza, diminuiu-se a vazão para $3,00 \text{ mL/min}$. Essa alteração diminuiu a pressão, tornando o manuseio do sistema menos crítico e possibilitou a injeção de quantidades maiores de massa. Para escolher a massa a ser injetada, fez-se uma curva de concentração, obtendo-se linha de base ou na ocorrência do “toque de banda” (Figura 4). Essa curva foi construída da seguinte maneira: tomou-se a quantidade máxima separável obtida na ampliação da escala, da coluna analítica para a semipreparativa,

dobrando-se valor de concentração para, em seguida, estabelecer-se concentrações em até 10,0 g/L, como mostra a Figura 4.

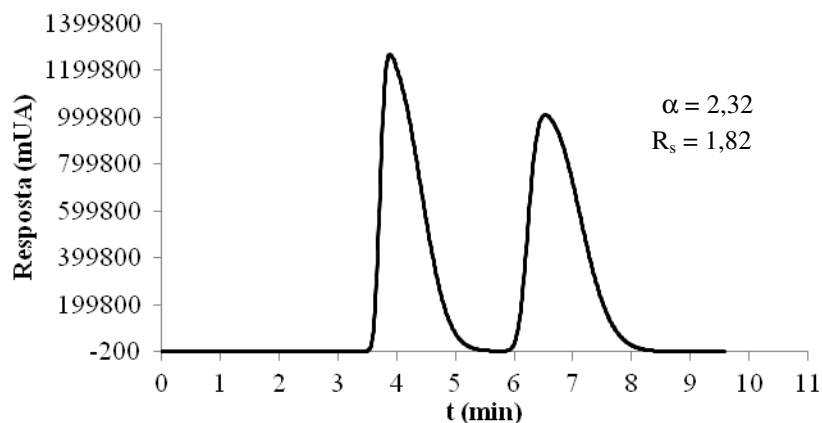


Figura 3. Cromatograma da mistura pseudo-binária. $Q = 1,00$ mL/min; $T = 35$ °C; Pressão= 84 kgf/cm²; $V_{\text{injeção}} = 50$ µL; Detecção UV= 245 nm; Coluna= $25 \times 0,46$ cm; $C = 1,00$ g/L (85% de piperonal + 10% de safrol).

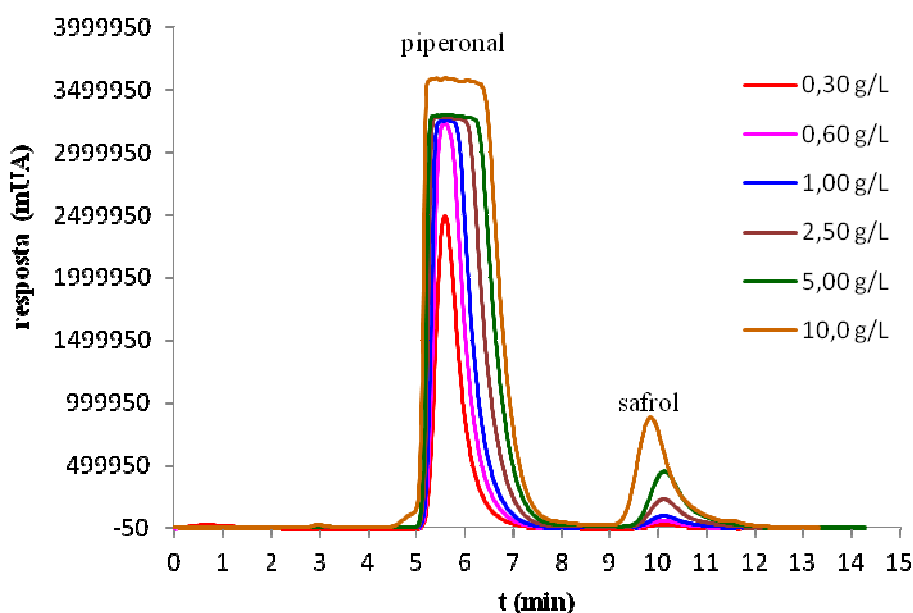


Figura 4. Aumento da concentração. $Q = 3,00$ mL/min; $T = 35$ °C; Pressão= 33 kgf/cm²; $V_{\text{injeção}} = 800$ µL; Detecção UV= 260 nm; coluna= $25 \times 1,0$ cm.

Procedimento análogo foi adotado por Zongde *et al.* (2005) na resolução de mistura binária, obtendo resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Além disso, em laboratórios de pesquisa, normalmente a pureza é que governa as separações tanto em escala analítica quanto em escala semipreparativa (Guiochon *et al.* 2006). Nota-se, na Figura 4, que se poderia obter pureza e produção máximas em uma análise com solução cuja concentração é

0,60 g/L. Ainda sim, é esperado que a produção do componente desejado seja pequena. Para aumentar essa produção, escolheu-se a concentração de 10,0 g/L (Tabela 2).

3.2 Separação em escala semipreparativa

Os resultados obtidos para as soluções diluída e concentrada estão apresentados nas Figuras 5a, 5b e Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de desempenho

C (g/L)	n°. Injeções	Pureza(%)	Recuperação (%)	Produção (mg/min)
0,60	6	99,00	99,00	0,036
10,00	5	99,00	97,47	0,705

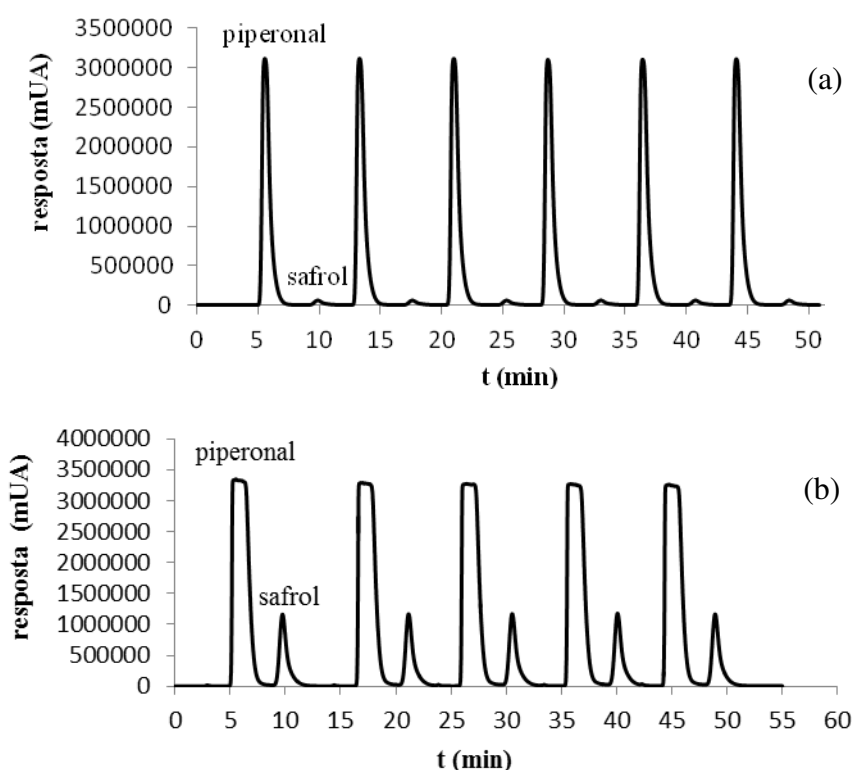


Figura 6. Injeções empilhadas: Q= 3,00 mL/min; T= 35 °C; Pressão= 33 kgf/cm²; V_{injeção}= 800 µL; Detecção UV: 260 nm; Coluna= 25 x 1,0 cm. (a) 0,6 g/L (b) 10,0 g/L.

Por inspeção da Tabela 1, constata-se o mesmo valor de pureza para ambas as soluções. Todavia, a produção de piperonal, para a solução concentrada, é cerca de vinte vezes maior do que a produção apresentada pela solução mais diluída, como era esperado, na mesma pureza, porém com recuperação relativamente menor (Tabela 1). Isto mostra que a pureza independe da concentração ou da quantidade injetada no intervalo estudado. Estudos mostram que a HPLC semipreparativa é uma técnica que fornece altas purezas, mesmo para misturas mais concentradas ou até mesmo multicomponentes. Entretanto, parte do trabalho de

pesquisa, deve envolver a busca por um equilíbrio entre pureza, recuperação e produção (Do *et al* 2014; Zongde *et al.* 2005; White 2005; Huber e Majors, 2007).

4. CONCLUSÃO

A HPLC semipreparativa mostrou-se bastante efetiva quanto à concentração de piperonal com elevado grau de pureza. Além disso, a quantidade de massa injetada não afeta significativamente a pureza. Os resultados indicam, também, que uma quantidade maior de amostra pode ser injetada e que as informações operacionais apresentadas neste estudo podem ser indicadas para cromatografia preparativa para obter grandes quantidades piperonal puro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAIR, E. A; HILL, D. The Welsbach Corporation. Process for producing aromatic carbonyl compounds and peroxide compounds. USA n. 2916499, 1959.
- BRAGA, N. P. Processo de obtenção e separação do piperonal a partir do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC). Campinas, 2007. 265 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia *In*: COLLINS *et al.* (Org.). Fundamentos de cromatografia. Campinas: editora da UNICAMP, 2006.
- DO, T. K. T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). *J. Chromatogr. A*, v. 1325, 256-260, 2014.
- FARINACCI, N. T. Oxidation of organic Compounds with a chromic oxidizing agent. USA n. 2794813, 1957.
- GUIOCHON, G.; FELINGER, A.; SHIRAZI, D. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of prepetive and nonlinear Chromatography*. San Diego: Elsevier, 2006.
- HUBER, U.; MAJORS, R. E. *Principles in preparative HPLC*. Germany: Agilent Technology Inc., 2007.
- SANTOS, A. S.; PEREIRA JR, N.; SILVA, I. M.; SARQUIS, M. I.; ANTUNES, O. A. C. Peroxidase catalyzed microbiological oxidation of isosafrol into piperonal. *Process Biochem.* v. 39, 2269-2275, 2004.
- SCHUUR, B.; HAAN, A. B.; KASPEREIT, M.; LEEMAN, M. Chiral Separation in Moo-Young, M. *Comprehensive Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- TORRI, S; UNEYAMA, K.; UEDA, K. Electrochemical Procedure for a pratical preparation of piperonal from isosafrole. *J. Org. Chem.* v. 49, n. 10, p. 1830-1832, 1984.
- WAKSMUNDAZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press: Boca Raton, 2011.

WHITE, C. Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool Part I. Fast chiral screening and purification. *J. Chromatogr. A*, v. 1074, p. 163–173, 2005

ZONGDE, Z.; XINGPING, L.; XIAOMEI, W.; HONG, Z.; YANPING, S.; LIREN, C.; YONGMIN, L. Analytical and semipreparative resolution of enantiomers of albendazole sulfoxide by HPLC on amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 62, p. 69-79, 2005.