

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS

**SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA QUIRAL DO
O,P'-DICLORODIFENILDICLOROETANO (MITOTANO) EM FASE
ESTACIONÁRIA QUIRAL O,O'BIS[4-*TERC*-BUTILBENZOIL]-N,N'-DIALIL-L-
TARTARDIAMIDA**

Autora: Raquel Macedo Dias

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Abril 2007

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	T/UNICAMP
	D543s
V. _____	Ed. _____
TOMBO BC/	72996
PROC.	16.145-07
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	20/06/07
BIB-ID	413629

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

D543s Dias, Raquel Macedo
Separação cromatográfica quiral do o,p'-
diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária
quiral O,O' bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-
tartardiamida / Raquel Macedo Dias.--Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientador: Cesar Costapinto Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Enantiômeros. 2. Cromatografia líquida de alta
eficiência. 3. Quiralidade – Aplicações industriais. I.
Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Chiral chromatographic separation of the o,p'-
dichlorodiphenyldichloroethane (mitotane) using chiral
stationary phase O,O'-bis[4-*terc*-butylbenzoyl] – N,N' –
diallyl-L-tartardiamide.

Palavras-chave em Inglês: Mitotane, Chiral chromatography, Enantiomers
separation, Simulated moving bed.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Brás Heleno de Oliveira e Isabel Cristina Sales Fontes
Jardim.

Data da defesa: 23/04/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Raquel Macedo Dias e aprovada em 23 de abril de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

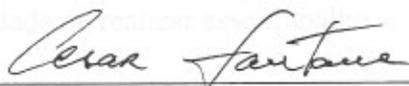


Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

2007-258-26

Agradecimentos

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador

Agradecimentos

A Deus pela vida.

Aos meus pais pela educação, amizade, apoio em todos os momentos da minha vida, confiança, carinho e força. Aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado.

Ao professor Cesar Santana pela orientação.

À Unicamp pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À CAPES pelo bolsa de mestrado.

Ao professor Everson por disponibilizar o equipamento de cromatografia e o laboratório.

Aos colegas de laboratório: Alessandra, Amaro, Ivanildo, João Paulo, Liane, Rosana e Vinicius pelo companheirismo, amizade, ajuda, força e dicas.

Às amigas Bruna, Carmen e Paula pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

Resumo

O mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano) é um fármaco utilizado no tratamento de carcinoma adrenocortical. Ele é comercializado na forma racêmica, ou seja, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R e S. A influência da quiralidade da molécula sobre seu efeito farmacológico ainda não foi estudada. Portanto, a separação dos enantiômeros é importante para testes biológicos comparativos de efeitos colaterais. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar a separação deste fármaco pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna recheada com a fase estacionária quiral O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. Diferentes combinações de fase móvel foram testadas e os melhores resultados foram obtidos com hexano/acetato de etila na proporção 95/5 (v/v). Experimentos de pulsos com soluções diluídas do traçador e dos enantiômeros do mitotano foram realizados variando a vazão de fase móvel e a temperatura do sistema. Foram determinados as porosidades do sistema, os parâmetros cromatográficos, os dados de equilíbrio, coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa. Os resultados mostraram separação satisfatória, com número de pratos superando 9000 e fatores de separação na ordem de 1,13. Os valores dos coeficientes de Henry foram maiores que a unidade para ambos os enantiômeros, sendo que o enantiômero mais retido R-(+)-mitotano, apresentou maior afinidade pela coluna quiral. Valores de k_m superiores a 300 min^{-1} revelaram baixo efeito dos fenômenos de transferência de massa e conseqüentemente predomínio dos efeitos termodinâmicos (energia entálpica superior -10 kJ/mol para os enantiômeros). Experimentos a altas concentrações foram realizados com a finalidade de se determinar às isotermas pelo método da análise frontal e também os cromatogramas sob estas condições. Para a concentração da mistura até 16 g/L as isotermas mostraram um bom ajuste ao modelo de Langmuir. A partir da separação em batelada determinaram-se as regiões de separação dos enantiômeros para um sistema cromatográfico contínuo do tipo leito móvel simulado para diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica. Avaliaram-se as variáveis desempenho (consumo de solvente e produtividade) no sistema contínuo e compararam-se com as obtidas em separações em batelada. Melhores resultados foram obtidos para um sistema contínuo do tipo leito móvel simulado.

Palavras chave: mitotano, cromatografia líquida quiral, separação de enantiômeros, leito móvel simulado.

Abstract

Mitotane (o, p'-dichlorodiphenyldichloroethane) is a drug used in the treatment of adrenocortical carcinoma. It is marketed in the racemic form, proportion 1:1 of their R and S enantiomers. The influence of the molecule chirality on its pharmacology effect was not studied yet. For this reason, this separation is important for comparative biological tests of collateral effects. This work was developed with intention to study the separation of this drug via liquid chromatography using columns packed with the chiral stationary phase, O,O'-bis[4-*tert*-butylbenzoyl] - N, N' - diallyl-L-tartardiamide. Different combinations of mobile phase was tested and better results were achieved with hexane/ethyl acetate in ratio 95/5 (v/v). Pulse experiments with diluted solutions of the inert and the enantiomers were accomplished at different flow rates and temperature. The system porosities, chromatographic parameters, equilibrium constants, axial dispersion and mass transference parameters were obtained. The results showed satisfactory separation, with number of plates overcoming 9000 and separation factors in the order of 1,13. The values of Henry coefficients were greater than one for both enantiomers, the most retained was R (+) - mitotane, and it presented greater affinity for the chiral column. The overall mass transfer coefficient achieved values higher than 300 min^{-1} , demonstrating low mass transfer effect rates and consequently a prevalence of the thermodynamic effects (enthalpy energy greater than -10 kJ/mol for the enantiomers). Experiments in overload conditions were realized in order to determine the isotherms using the method of the frontal analysis as well the chromatograms under these conditions. For the concentration of the mixture smaller than 16 g/L the isotherms showed a good adjusted to the Langmuir model. The separation regions for a chromatographic continuous system like simulated moving bed were determined with different feed concentrations. This permits the comparison of the performance parameters using the continuous system and batch ones.

Keywords: mitotane, chiral chromatography, enantiomers separation, simulated moving bed

Sumário

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	x
Nomenclatura	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos	10
3. Revisão Bibliográfica	11
3.1. Mitotano e Carcinoma Adrenocortical	11
3.2. Cromatografia Líquida Quiral	15
3.2.1. Fundamentos	15
3.2.2. Aspectos Gerais	21
3.3. Método dos Momentos	26
3.4. Análise Termodinâmica	37
3.5. Isotermas	45
3.6. Condições de Sobrecarga	53
3.6.1. Cromatografia em Batelada	53
3.6.2. Leito Móvel Simulado	58
4. Materiais e Métodos	69
4.1. Materiais	69
4.1.1. Mitotano	69
4.1.2. Fase estacionária quiral	69
4.1.3. Composto não retido	71
4.1.4. Fase móvel	72
4.1.5. Aparelhagem experimental	72
4.2. Métodos	73
4.2.1. Experimentos preliminares	73
4.2.1.1. Definição da fase móvel	73
4.2.1.2. Análise da resposta do sistema de detecção	74
4.2.1.3. Determinação da ordem de eluição	74
4.2.2. Experimentos com soluções diluídas	74
4.2.2.1. Determinação das porosidades	74
4.2.2.2. Determinação dos parâmetros cromatográficos	76

4.2.2.3. Determinação das constantes de equilíbrio e constantes de Henry	76
4.2.2.4. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa	77
4.2.2.5. Análise termodinâmica	77
4.2.3. Experimentos com soluções concentradas	78
4.2.3.1. Determinação das isotermas de adsorção	78
4.2.3.2. Estudo de sobrecarga na coluna	78
5. Resultados e Discussão	80
5.1. Definição da fase móvel	80
5.2. Avaliação da resposta do sistema de detecção	89
5.3. Ordem de eluição	89
5.4. Parâmetros de separação cromatográfica	90
5.5. Determinação das porosidades, constantes de equilíbrio e constantes de Henry	74
5.6. Determinação dos parâmetros de transferência de massa	98
5.7. Análise Termodinâmica	104
5.8. Isotermas de adsorção	107
5.9. Estudo de sobrecarga	110
5.9.1. Operação em batelada	110
5.9.2. Estudo visando a separação em Leito Móvel Simulado	112
6. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	122
6.1. Conclusões	122
6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	123
7. Referências Bibliográficas	124

Lista de Figuras

Figura 1.1. Aplicação da nomenclatura R e S de Cahn-Ingold-Prelog.	2
Figura 1.2. Técnicas usadas em separações enantioméricas.	9
Figura 3.1. Estrutura química do mitotano. O carbono identificado com ★ é quiral.	12
Figura 3.2. Esquema de um equipamento de HPLC.	16
Figura 3.3. Relação entre largura de um pico na base, a meia altura, a e b a 10%.	19
Figura 3.4. Relação entre H e velocidade da fase móvel (u).	36
Figura 3.5. Ilustração de um cromatograma usado no cálculo da concentração de equilíbrio na superfície.	50
Figura 3.6. Perfil de concentração no eluente após um degrau de concentração de uma solução binária.	52
Figura 3.7. Esquema de uma unidade de quatro seções de contracorrente verdadeira para separação contínua: separação binária de um componente mais retido A e menos retido B.	60
Figura 3.8. Esquema de uma unidade de leito móvel simulado de quatro seções para separações contínuas com distribuição de portas 2-2-2-2.	61
Figura 3.9. Região de um plano (m_2 , m_3) com diferentes regimes de separação em termos de pureza das correntes de saída para um sistema descrito por isotermas de adsorção do tipo Langmuir.	66
Figura 4.1. Seqüência reacional para produção do polímero quiral a ser ligado à sílica para formar a fase estacionária.	70
Figura 4.2. Estrutura molecular da FEQ O,O'-bis[4- <i>terc</i> -butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. R denota a repetição da unidade do seletor.	70
Figura 4.3. Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri- <i>terc</i> -butilbenzeno (TTBB).	72
Figura 4.4. Estrutura molecular do composto poliestireno.	76
Figura 5.1. Cromatograma de separação dos enantiômeros do mitotano. Fase móvel 100 % hexano, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.	80
Figura 5.2. k_i e R_s em função da % de THF, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.	81
Figura 5.3. k_i e R_s em função da % de etanol, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.	82
Figura 5.4. k_i e R_s em função da % de isopropanol, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.	82
Figura 5.5. k_i e R_s em função da % de acetato de etila, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.	83

Figura 5.6. Variação do fator de retenção dos enantiômeros com a quantidade de modificador.	85
Figura 5.7. Variação do fator de separação calculados e obtidos experimentalmente com a quantidade de modificador.	87
Figura 5.8. Cromatograma mostrando a ordem de eluição dos enantiômeros do mitotano. $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, $Q = 2,0 \text{ mL/min}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$.	90
Figura 5.9. Cromatograma do composto inerte TTBB. $c_{TTBB} = 1,0 \text{ mg/mL}$ e $Q = 1 \text{ mL/min}$.	91
Figura 5.10. Cromatograma da separação dos enantiômeros do mitotano. $c_{mistura} = 0,2 \text{ mg/mL}$ e $Q = 1 \text{ mL/min}$.	91
Figura 5.11. Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão e temperatura.	93
Figura 5.12. Variação do tempo de retenção dos enantiômeros com a temperatura para diferentes vazões. Símbolos preenchidos para o S-(-) e vazados para o R-(+).	93
Figura 5.13. Primeiro momento para o composto inerte TTBB a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.	95
Figura 5.14. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.	95
Figura 5.15. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.	96
Figura 5.16. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.	96
Figura 5.17. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a $55 \text{ }^\circ\text{C}$.	96
Figura 5.18. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S-(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.	100
Figura 5.19. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S-(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.	100
Figura 5.20. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S-(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$.	101
Figura 5.21. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, fase móvel 95% hexano e 5% acetato etila.	104
Figura 5.22. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, fase móvel 95% hexano e 5% THF.	105
Figura 5.23. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, modificador acetato de etila (símbolos ■) e modificador THF (símbolos ●).	106

Figura 5.24. Curvas de ruptura para os enantiômeros do mitotano com concentração de alimentação de 1g/L.	108
Figura 5.25. Isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano obtidos pelo método da análise frontal.	109
Figura 5.26. Cromatogramas obtidos na separação da mistura enantiomérica em diferentes concentrações de alimentação.	110
Figura 5.27. Consumo de dessorvente e produtividade em função da concentração de alimentação da mistura racêmica.	111
Figura 5.28. Regiões de separação dos enantiômeros no plano (m_2 , m_3) de acordo com a teoria do equilíbrio para várias concentrações de alimentação da mistura racêmica.	113
Figura 5.29. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação.	115
Figura 5.30. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando t^* .	116
Figura 5.31. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando Q_1 .	117
Figura 5.32. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando Q_4 .	118
Figura 5.33. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação.	120

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Vendas mundiais de fármacos.	7
Tabela 3.1. Estrutura química das FEQs baseadas em tartardiamida.	23
Tabela 5.1. Valores de α calculados para os experimentos realizados com o objetivo de otimização da fase móvel.	84
Tabela 5.2. Valores de k_0 e S para ambos os enantiômeros para os modificadores estudados.	86
Tabela 5.3. Valores de R_s , k_i e α obtidos para os alguns dos experimentos realizados com HFE-720 3M e modificadores.	88
Tabela 5.4. Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do mitotano em diferentes vazões de fase móvel a 25 °C.	92
Tabela 5.5. Efeito da temperatura nos parâmetros de separação, $Q = 1\text{mL}/\text{min}$.	94
Tabela 5.6. Valores de K para os enantiômeros do mitotano a diferentes temperaturas.	97
Tabela 5.7. Valores de H para os enantiômeros do mitotano em diferentes temperaturas.	98
Tabela 5.8. Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas.	99
Tabela 5.9. Parâmetros da equação de van Deemter para os enantiômeros do mitotano.	101
Tabela 5.10. Coeficientes de dispersão axial e parâmetro de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano.	103
Tabela 5.11. Coeficientes de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano, bupivacaína e rolipram.	104
Tabela 5.12. Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do mitotano.	105
Tabela 5.13. Parâmetros termodinâmicos e temperatura enantiosseletiva.	106
Tabela 5.14. Coeficientes da isoterma dos enantiômeros do mitotano.	109
Tabela 5.15. Produtividade de cada enantiômero em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para operação em batelada.	112
Tabela 5.16. Valores de m_2 e m_3 obtidos pela teoria do triângulo nas condições de operação ótimas.	114
Tabela 5.17. Vazões nas seções para diferentes concentrações de alimentação.	115
Tabela 5.18. Produtividade em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para um sistema LMS com colunas de diâmetro de 1cm.	119
Tabela 5.19. Vazões nas seções para diferentes concentrações de alimentação.	120

Tabela 5.20. Produtividade em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para um sistema LMS com colunas de diâmetro de 5cm. 121

Nomenclatura

a	Medida da banda esquerda do pico a 10% da altura (cm)
a_i	Parâmetro do modelo de Langmuir
A	Coefficiente da equação de van Deemter
AS_{10}	Fator de assimetria
b	Medida da banda direita do pico a 10% da altura (cm)
b_i	Parâmetro do modelo de Langmuir (mL/mg)
B	Coefficiente da equação de van Deemter
c_i	Concentração do componente i na fase líquida (mg/mL)
$c_{i,a}$	Concentração do componente i na alimentação da coluna (mg/mL)
$c_{\text{alim},A}$	Concentração do componente A na alimentação da coluna (mg/mL)
$c_{\text{alim},B}$	Concentração do componente B na alimentação da coluna (mg/mL)
c_b	Concentração do componente i na fase líquida (mg/mL)
$c_{i,b}$	Concentração do componente i na segunda frente de adsorção (mg/mL)
$c_{i,m}$	Concentração do soluto i no platô intermediário (mg/mL)
c_{sai}	Concentração do soluto i na saída da coluna (mg/mL)
C	Coefficiente da equação de van Deemter
CD	Consumo de dessorvente (L/g)
d_p	Diâmetro das partículas (μm)
D_a	Coefficiente aparente de dispersão axial
D_L	Coefficiente de dispersão axial
D_m	Difusividade molecular
F	Razão de fase
H	Altura equivalente a um prato (cm)
H	Constante de Henry
k	Fator de retenção
k_{oi}	Fator de retenção do solvente puro
k_m	Coefficiente de transferência de massa global (min^{-1})
K	Constante de equilíbrio
L	Comprimento da coluna (cm)
m_j	razão de vazão
N	Número de pratos

Prod	Produtividade (g/dia L de adsorvente)
q_i	Concentração do componente i na fase estacionária (mg/mL)
q_i^*	q_i em equilíbrio com c_i
q_s	Capacidade de saturação (mg/mL)
Q	Vazão de fase móvel (mL/min)
Q_1	Vazão volumétrica na seção 1 da unidade LMS (mL/min)
Q_2	Vazão volumétrica na seção 2 da unidade LMS (mL/min)
Q_3	Vazão volumétrica na seção 3 da unidade LMS (mL/min)
Q_4	Vazão volumétrica na seção 4 da unidade LMS (mL/min)
Q_E	Vazão volumétrica na corrente de extrato da unidade LMS (mL/min)
Q_F	Vazão volumétrica na corrente de refinado da unidade LMS (mL/min)
Q_R	Vazão volumétrica de alimentação da unidade LMS (mL/min)
Q_S	Vazão volumétrica de sólido na unidade LMS (mL/min)
Q^{LMS}	Vazão volumétrica na unidade LMS (mL/min)
Q^{LMV}	Vazão volumétrica na unidade LMV (mL/min)
R	Constante dos gases ideais
R_s	Resolução do sistema
S_b	Número de subseções na seção j da unidade LMS
S	Fator força peso do solvente
t	coordenada de tempo (min)
t_M	Tempo de retenção de um composto não retido (min)
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do soluto i (min)
t^*	Tempo de troca da unidade LMS
t_{op}	Tempo de operação (min)
T	Temperatura (K)
T_c	Temperatura de compensação (K)
T_{iso}	Temperatura isoenantiosseletividade (°C)
u	Velocidade superficial da fase móvel (cm/s)
u_0	Velocidade intersticial da fase móvel (cm/s)
V_{ads}	Volume de adsorvente (mL)
V_D	Volume morto (mL)
V_{inj}	Volume de injeção
V_J	Volume da seção j da unidade LMV (mL)

V	Volume do leito fixo da unidade LMS (mL)
V_T	Volume da coluna (mL)
V_1	Volume de retenção da primeira frente de adsorção (mL)
V_2	Volume de retenção da segunda frente de adsorção (mL)
w_b	Largura do pico na base
w_h	Largura do pico a meia altura
z	Comprimento longitudinal da coluna (cm)
ΔG^0	Energia livre de Gibbs (kJ/mol)
$\Delta G_{T_c}^0$	Energia livre de Gibbs na T_c (kJ/mol)
ΔH^0	Entalpia de adsorção (kJ/mol)
ΔS^0	Entropia de adsorção (J/mol.K)
$\Delta \Delta G^0$	Variação da energia livre de Gibbs (kJ/mol)
$\Delta \Delta H^0$	Variação da entalpia de adsorção (kJ/mol)
$\Delta \Delta S^0$	Variação da entropia de adsorção (J/mol.K)

Símbolos gregos

α	Fator de separação
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
λ	Comprimento de onda (nm)
μ_n	n-ésimo momento
γ_1	Parâmetro da equação da dispersão axial
γ_2	Parâmetro da equação da dispersão axial
Φ	Razão de fase
σ^2	Variância
θ	Fração do modificador da fase móvel

Abreviaturas

CAC	Carcinoma Adrenocortical
DATD	Dialil-L-tartardiamida
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LMS	Leito móvel simulado
LMV	Leito móvel verdadeiro
M	Massa molar
MTBE	Etér metil <i>terc</i> butílico
THF	Tetrahydrofurano
TBB	<i>Terc</i> -butilbenzoil
TTBB	1,3,5-tri- <i>terc</i> -butilbenzeno
UV-Vis	Ultravioleta visível

1. INTRODUÇÃO

Em 1883, Kelvin usou o termo quiralidade, derivada da palavra grega *kneir* para mãos. Qualquer objeto desprovido dos três elementos de simetria - plano, centro e eixo de simetria - e que exista em mais de uma forma na qual são imagens espelhadas uma da outra, são chamados de objetos quirais. De partículas elementares a humanas, a quiralidade é encontrada em uma variedade muito grande de objetos (ALI; GUPTA; ABOUL-ENEIN, 2003).

Estruturas isoméricas (do grego *isômere* = parte igual) que diferem entre si unicamente pelo arranjo tridimensional dos seus constituintes são chamadas de estereoisômeros. Uma molécula é quiral quando a sua imagem especular não pode ser sobreposta à molécula original. Se houver possibilidade de sobreposição entre uma molécula e sua imagem especular ela é aquiral. Um centro assimétrico é aquele no qual os substituintes ligados a eles são diferentes entre si. O tipo mais comum de uma molécula quiral contém um carbono tetraédrico, no qual estão ligados quatro diferentes grupos. O átomo de carbono é o centro estereogênico ou assimétrico da molécula. Uma molécula desse tipo pode existir em dois arranjos espaciais diferentes, que são estereoisômeros um do outro. As duas estruturas, entretanto, não podem ser sobrepostas, já que uma é a imagem espelhada da outra. Esses tipos de estereoisômeros são chamados de enantiômeros (do grego, *enantio* = opostos). A única diferença que esses enantiômeros apresentam é a propriedade de desviar o plano da luz polarizada, quando uma solução de cada uma delas é submetida a um equipamento polarimétrico (COELHO, 2001).

Os enantiômeros possuem propriedades físicas e químicas idênticas, exceto quando eles interagem com enzimas ou com outras moléculas quirais, reagindo diferentemente ou seletivamente. Esta enantiosseletividade resulta em diferentes taxas de transformação microbiológica e diferenças na atividade e na toxicidade dos dois enantiômeros.

Cahn, Ingold e Prelog estabeleceram uma nomenclatura baseada em uma prioridade entre os diferentes substituintes ligados ao carbono assimétrico. A regra baseia-se na massa molar dos átomos ligados ao carbono estereogênico. As seguintes regras de

atribuição de prioridade são aplicadas sucessivamente até ser possível uma decisão (ALLINGER, 1983):

- átomos de número atômico superior tem maior prioridade do que átomos de número atômico inferior.

- quando os dois átomos ligados são iguais, amplia-se a comparação aos átomos ligados a estes, até se poder tomar uma decisão. Por exemplo, CCl_3 tem prioridade sobre CH_3 , pois Cl tem número atômico superior a H. Da mesma forma, CCl_3 tem prioridade sobre CHCl_2 , pois a sequência de números atômicos ligados ao carbono no CCl_3 (17, 17, 17) é superior ao verificado no CHCl_2 (17, 17, 1). Ao comparar dois conjuntos de números considera-se como o conjunto mais baixo o que tiver o número individual menor ao aparecer à primeira diferença.

- a existência de ligações múltiplas é equivalente à existência de ligações simples a dois ou três átomos iguais. Cada carbono da ligação dupla tem dois substituintes.

O passo seguinte é orientar a molécula de forma a que o substituinte de menor prioridade aponte no sentido oposto ao observador. Se os outros três substituintes estiverem distribuídos de forma a que o percurso do substituinte de maior prioridade para o de menor prioridade for no sentido dos ponteiros do relógio a configuração denomina-se R (do latim *rectus*, que significa direita). Se eles estiverem dispostos no sentido oposto ao dos ponteiros do relógio a configuração denomina-se S (do latim *sinister*, que significa esquerda). Um exemplo é apresentado na Figura 1.1.

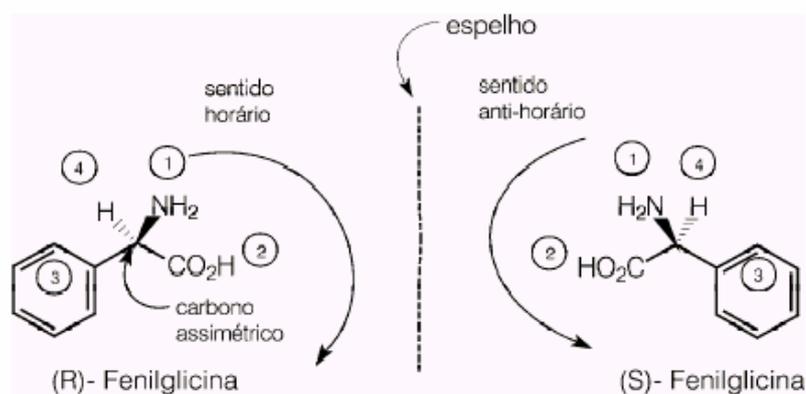


Figura 1.1. Aplicação da nomenclatura R e S de Cahn-Ingold-Prelog.

A ação de um fármaco é resultante de processos farmacológicos e farmacocinéticos, nos quais o medicamento entra, interage, e deixa o corpo humano. Há muitos exemplos nos quais estereoisômeros mostraram diferenças em termos de biodisponibilidade, distribuição, comportamento metabólico e de excreção, e onde parâmetros estereoquímicos têm significado fundamental na sua ação e disposição em sistemas biológicos (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

O alto grau de estereosseletividade de muitos processos biológicos faz com que, quando uma dada mistura racêmica é administrada como fármaco, ambos os enantiômeros podem não ser igualmente ativos. Muitas vezes um deles representa o isômero mais ativo, enquanto o outro pode até mesmo agir de um jeito diferente, contribuindo para efeitos indesejados, exibindo toxicidade e agindo antagonicamente (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Um fármaco pode exercer a sua atividade no interior do corpo humano de várias formas. Uma dessas formas é através da interação com estruturas chamadas receptoras, que podem ser proteínas de elevado grau de organização espacial, que se encontram na membrana da célula. Esses receptores agem como pequenos interruptores de grande seletividade. Uma vez ligados, eles podem desencadear uma série de reações intracelulares para dar origem a um efeito biológico. Um fármaco também pode interagir com uma enzima, que é uma proteína de elevado nível de organização (COELHO, 2001).

O fármaco deve ter um arranjo espacial de sua estrutura bem definido e deve coincidir com aquela da estrutura com a qual irá interagir. Se numa determinada molécula o arranjo espacial do centro assimétrico é invertido, pode-se impedir que ocorra uma das interações, levando a uma modificação do efeito biológico, ou até mesmo a inativação do fármaco, ou o aparecimento de um efeito contrário (COELHO, 2001).

Como já mencionado anteriormente, a indução da quiralidade ou a resolução de compostos racêmicos necessita da presença de um ambiente quiral. Para este propósito, auxiliares quirais, catalisadores ou seletores, são necessários. A formação de espécies diastereoméricas implica em diferenças energéticas a qual permite em muitos casos suas enantiodiscriminação. Esses diastereômeros podem ser formados covalentemente e então sua separação pode ser alcançada tirando vantagem de suas diferenças químicas ou propriedades físicas por cristalização, cromatografia não estereosseletiva ou destilação.

Então, o enantiômero puro é isolado indiretamente após a liberação do auxiliar quiral. Essa metodologia, entretanto, apresenta algumas desvantagens (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Alternativamente, metodologias diretas são geralmente baseadas na formação de pares diastereoméricos não covalentes de moléculas associadas, espacialmente orientadas e estáveis. Forças tais como eletrostáticas, ligação de hidrogênio, atração/repulsão, van der Waals, interações π - π , interações dipolares, complexo de inclusão e impedimento estérico contribuem para esse processo. Esse método pode ser realizado com a interação da mistura enantiomérica com um seletor quiral, tanto sendo parte de uma fase estacionária quiral, como uma fase móvel aditiva quiral (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Em escalas preparativas, diferentes objetivos e alvos são abordados, é necessária uma apropriada enantiosseletividade, uma alta capacidade, além de a fase estacionária quiral ser estável termicamente, e também que os enantiômeros sejam separados. Seletores quirais ideais para aplicações preparativas devem estar disponíveis e /ou sintetizados para serem competitivos economicamente com técnicas já estabelecidas, é importante também que a amostra seja solúvel no meio onde irá ocorrer à separação levando-se em conta a produtividade. Metodologias cromatográficas são as técnicas mais utilizadas (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Geralmente qualquer separação enantiomérica pode ser realizada com pelo menos um dos 200 seletores quirais disponíveis comercialmente, entretanto um dos problemas é a seleção de sistemas apropriados devido ao constante crescimento do número destes seletores. Frequentemente, a identificação de seletores adequados para um par de enantiômeros específicos requer experimentos e demanda tempo e material (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

O entendimento de como e onde um reconhecimento quiral por um seletor quiral molecular ocorre pode fornecer informações valiosas a respeito da estimativa da magnitude da enantiosseparação; tipos de compostos separados por um dado seletor; previsões sobre a ordem de eluição; e condições cromatográficas adequadas. É desejável obterem modelos que explicam as forças de ligações agindo no enantiômero mais favorecido e entender qualitativamente as razões pelas quais o menos favorecido possui realmente ligações menos

eficientes. Poucos estudos detalhados dos mecanismos de separação quirais estão disponíveis se comparado com o número de seletores quirais eficazes (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Apesar do fato dos cientistas serem extremamente cientes das diferenças que os enantiômeros podem exercer, desde mais de duas décadas, o principal avanço no desenvolvimento de compostos enantiomericamente puros tem sido realizado nos últimos anos com novas metodologias de síntese assimétricas e boas técnicas de separação analíticas e preparativas. Até o começo desta década, a comercialização de medicamentos enantiomericamente puros era somente recomendada como um desafio desejável com muitas limitações práticas. As autoridades somente encorajavam as indústrias farmacêuticas a fornecerem enantiômeros puros, apesar da maioria deles serem comercializados como racematos. Hoje a situação mudou, avanços tecnológicos têm permitido a produção de enantiômeros puros comercialmente. Além disso, o FDA tem definido solicitações mais restritas para a criação de patente de novos medicamentos racêmicos, exigindo todos os documentos de separação farmacológica e perfis farmacocinéticos dos enantiômeros puros, bem como a da mistura. Isto também pode ser estendido para o agroquímicos nos quais a presença de estereoisômeros não ativos e menos ativos contribui para o aumento de nível de poluição (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Quando se trata de separação de quilogramas para toneladas de compostos quirais, considerações ecológicas e ambientais devem ser levadas em conta para a redução da toxicidade e perigo potencial do processo. As grandes quantidades de solventes usadas em cromatografia não são tão convenientes e métodos para seus ciclos são necessários (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Interesses econômicos são essenciais para o desenvolvimento de novas substâncias quirais e tecnologias. A venda de fármacos de enantiômeros puros mostra um crescimento mundial contínuo (21% de crescimento de 1997 em comparação com 1996) e muitos dos medicamentos mais vendidos são enantiômeros puros (269 das 500 mais vendidos). O foco de pesquisas de descoberta de novos medicamentos tem desviado de doenças agudas para crônicas, tais como câncer, AIDS, artrites, doenças neurológicas, um grande número de fármacos usados nesses tratamentos contém um ou mais centros estereogênicos (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

A significância econômica do mercado de fármacos no mundo é considerável, aproximadamente 300 bilhões de dólares em 1997. A competição entre as indústrias farmacêuticas é muito alta e para continuar crescendo elas investem altamente em metas produtivas agressivas. Medicamentos quirais apresentam um desafio em relação a investimentos e pesquisas (a venda de fármacos puros estereoquimicamente representou aproximadamente 28% do total de vendas em 1997) (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

O rendimento global de tecnologia quiral irá aumentar de 6,63 bilhões de dólares em 2000 para 16,03 bilhões em 2007, crescendo a uma taxa anual de 13,4% durante esse período, segundo previsão de pesquisas de mercado da empresa Frost e Sullivan. A indústria farmacêutica se responsabilizou por 81,2% do rendimento do mercado quiral em 2000, a agricultura por 14,1% e a área de perfumes e fragrância por 4,7%. Aproximadamente 80% de todos os produtos em desenvolvimento na indústria farmacêutica são baseados em compostos quirais de acordo com Karlheinz Drauz, vice-presidente da Degussa na Alemanha (GRAFF, 2002). A Tabela 1.1 apresenta as vendas mundiais de fármacos nos últimos anos tendo como fonte o Instituto de Tecnologia de Catalisadores.

A tecnologia quiral tem se preocupado em desenvolver novos produtos químicos na área agrícola tais como agrotóxicos. Porém, altos custos neste setor e a falta de pressões como na área farmacêutica levam esses produtos a não serem muito importantes no mercado em termos de tecnologia quiral. O crescimento na área de perfumes e fragrâncias sintéticas também tem sido limitado pela preferência do consumidor por extratos de produtos naturais. (GRAFF, 2002).

Do ponto de vista do consumidor, a administração de um fármaco em sua mistura racêmica tem algumas desvantagens: a dose a ser utilizada deve ser aumentada, pois somente metade dela pode ter o efeito farmacológico desejado; o paciente ingere, a cada dose, 50% de uma substância química, muitas vezes, desnecessária (COELHO, 2001).

Apesar do fato do desenvolvimento de medicamentos quirais implicar na classificação de três produtos desde o início até o tratamento clínico (o racemato, e os dois enantiômeros), os benefícios que o produto com enantiômero puro pode trazer às indústrias farmacêuticas são geralmente razões convincentes para a realização disso. Racematos,

como já mencionado, podem implicar riscos potenciais ao paciente devido tanto a sua toxicidade como aos efeitos indesejados de um dos estereoisômeros, a eficácia pode ser significativamente aumentada pela administração de apenas um enantiômero (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Tabela 1.1. Vendas mundiais de fármacos.

Milhões de dólares	Todos os fármacos		Fármacos com apenas um enantiômero		
	1999	2000	1999	2000	2005
Analgésicos	21500	23000	1173	1291	1395
Antibióticos	29300	31700	24918	26140	29747
Antivirais	17700	19100	6717	8820	12201
Câncer	13700	15600	8891	10690	13605
Cardiovascular	42700	46600	24895	27650	34627
Sistema nervoso Central	47700	53900	8439	9094	14700
Dermatologia	17900	18400	16202	1272	1540
Gastrintestinal	43900	42700	1970	4033	6590
Hematologia	16500	15400	7405	8879	11295
Hormônios/ Endocrinologia	20000	22000	14510	15384	19790
Oftalmologia	7100	7400	1270	2265	2705
Respiratórios	36500	40500	5696	6615	9620
Vacinas	6500	7300	2503	3349	4320
Outros	39000	41900	6248	7032	9730
Total	360000	390000	117763	132514	171865

Em meados de 1992, foi publicado um documento pela Administração de Fármacos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), no qual o centro de pesquisa e avaliação de fármacos do FDA (CDER) enumerou, pela primeira vez, um guia próprio para fármacos estereoisoméricos. Este concluiu que, apesar das substâncias terem sido desenvolvidas com sucesso e segurança como misturas racêmicas, têm sido relatados muitos casos em que os enantiômeros têm apresentado diferenças farmacológicas e de toxicidade, causando

problemas terapêuticos. O exemplo mais conhecido é o da talidomida, enquanto o S-enantiômero produzia efeitos terapêuticos, o R-enantiômero resultava na produção de defeitos físicos em crianças (HOFFMAN, 1997; ANON, 1992).

Devido a esses inúmeros casos e a outros relacionados, o FDA exige daquele que desenvolve o fármaco que: i) quantifique os efeitos farmacológicos e toxicológicos de cada enantiômero; ii) produza o enantiômero puro, se o resultado de farmacocinética e toxicidade destes são significativamente diferentes, afetando a dosagem e os efeitos colaterais (REKOSKE, 2001).

Essa regulamentação governamental produziu dois efeitos: mudança no desenvolvimento de fármacos voltado para implantação de apenas um enantiômero; estimular o desenvolvimento de novas técnicas para síntese assimétrica e separação enantiomérica. Esses efeitos acarretaram na necessidade da produção de novas tecnologias, criando novas pesquisas e desenvolvimento de novas oportunidades para engenheiros e cientistas. Técnicas de baixo custo e tempo foram imediatamente requeridas, as quais poderiam fornecer quantidades de material necessárias para testes toxicológicos e para produção comercial. Entre 1992 e 2000, o mercado mundial de componentes químicos opticamente puros aumentou de 30 bilhões de dólares para aproximadamente 100 bilhões (ANON, 1997).

Uma das primeiras técnicas a ganhar grande aceitação foi à cromatografia líquida preparativa de alta eficiência (HPLC), que tem sido usada para a produção de pequenas quantidades de substâncias quirais desde o aparecimento de fases estacionárias que 'reconhecem' enantiômeros. Em HPLC, a combinação apropriada entre a fase estacionária e a fase móvel, entre outros fatores, é escolhida para que permita a mistura racêmica ser eluída da coluna em tempos distintos (REKOSKE, 2001). A Figura 1.2 apresenta as técnicas mais utilizadas para separação de enantiômeros.

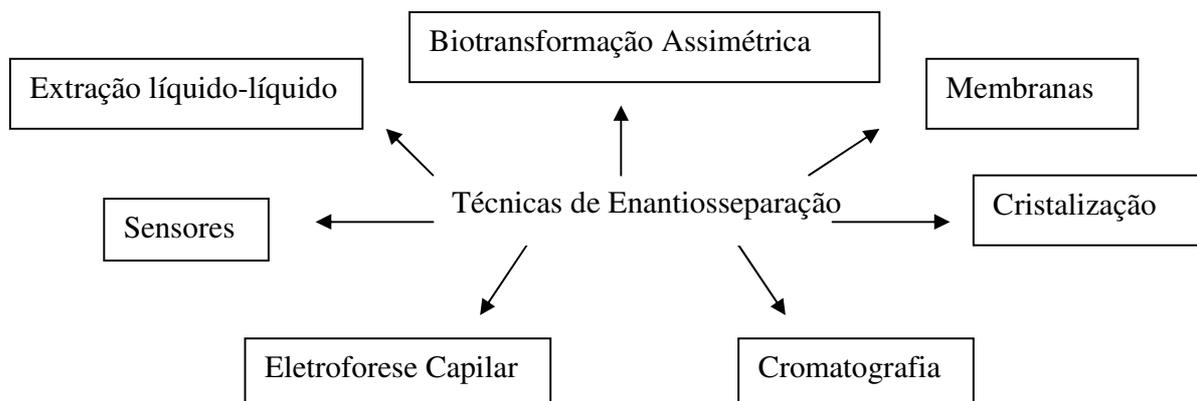


Figura 1.2. Técnicas usadas em separações enantioméricas.

O mitotano, que é um fármaco quiral, é comercializado na forma de mistura racêmica (mistura equimolar entre dois enantiômeros) e tem apresentado uma série de efeitos colaterais. A influência da quiralidade da molécula sobre seu efeito farmacológico ainda não foi estudada. Também não existem informações sobre os aspectos estereoquímicos da metabolização do mitotano. Como ocorre para outros medicamentos, é possível que exista diferença farmacológica entre os enantiômeros. A separação dos enantiômeros do mitotano por técnicas cromatográficas será, portanto, de fundamental interesse para o estudo da sua ação farmacológica.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi estudar a separação enantiomérica do mitotano através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna recheada com a fase estacionária quiral O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. Para atingir esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Avaliação das melhores condições de separação através da otimização da fase móvel.
- ✓ Determinação dos parâmetros de separação cromatográfica.
- ✓ Determinação dos coeficientes de Henry.
- ✓ Avaliação da eficiência de separação a partir do gráfico de van Deemter e determinação dos parâmetros de transferência de massa.
- ✓ Análise termodinâmica da separação.
- ✓ Determinação das isotermas de adsorção.
- ✓ Determinação dos perfis de eluição em condições de sobrecarga e avaliação das variáveis desempenho para diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica em um sistema de cromatografia em batelada.
- ✓ Determinação da região de separação dos enantiômeros para um sistema de cromatografia contínua, de acordo com a teoria do equilíbrio.
- ✓ Avaliação dos pontos ótimos de operação em relação as variáveis desempenho para diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica em um sistema de cromatografia contínua.
- ✓ Avaliação das variáveis desempenho ao aumentar-se o diâmetros das colunas em um sistema cromatográfico contínuo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mitotano e Carcinoma Adrenocortical

O carcinoma adrenocortical (CAC) é raro, atingindo 0,3/milhão de crianças até 15 anos. No sul do Brasil a incidência é singular, 10-15 vezes maior do que em outros locais do mundo (RIBEIRO *et al.*, 2000). O tratamento de primeira escolha é cirúrgico, sendo a única opção potencialmente curativa (POMMIER; BRENNAN, 1992; SCHULICK; BRENNAN, 1999).

Nos casos de CAC em que a ressecção completa não é possível está indicado o uso do fármaco mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano), geralmente, associado a outros antineoplásicos (WOOTEN; KING, 1993; BERRUTI *et al.*, 1998; KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; LIM *et al.*, 1990). Este fármaco tem sido bastante estudado em adultos, mas o relato de estudos clínicos com crianças, na literatura científica, é reduzido.

Em 1984, van Slooten *et al.* sugeriram que, para exercer plenamente sua ação terapêutica, a concentração plasmática do mitotano deve ser cerca de 14 µg/mL, porém estes autores alertaram sobre as reações adversas que são mais severas e mais frequentes em concentrações plasmáticas superiores a 20 µg/mL. Estes dados foram confirmados por Haak *et al.* (1994) e têm sido considerados como referência na monitorização das concentrações plasmáticas de mitotano (BAUDIN *et al.*, 2001; HEILMANN *et al.*, 2001; ANDERSEN; KASOERKIK-ZALUSKA; WARREN, 1999; BERRUTI *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 1995; BOOLEN; LANSER, 1992; MOOLENAR *et al.*, 1981).

Nas concentrações consideradas terapêuticas, (13-20 µg/mL), as reações adversas ao mitotano parecem ser inevitáveis (VAN SLOOTEN *et al.*, 1984). Doses diárias de 6-10 g causam toxicidade gastrointestinal em 80 % e disfunções neuromusculares ou sintomas psiquiátricos em 40 % dos pacientes (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004; BOOLEN; LANSER, 1992). A incidência, a severidade e a persistência dos efeitos

adversos dificultam o tratamento com mitotano, provocando reduções nas doses, interrupções ou até cessação do tratamento. Na ausência de uniformização da orientação quanto à dose de mitotano a ser utilizada em pacientes pediátricos, é necessário ajustá-la em função da concentração plasmática deste fármaco.

O mitotano, que está representado na Figura 3.1, quando associado ou não a outros agentes antineoplásicos, é indicado no tratamento de pacientes com CAC metastático, não ressecável, recidivado ou resultante de doença residual após cirurgia (LIM *et al.*, 1990; WOOTEN; KING, 1993; BERRUTI *et al.*, 1998; KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; ILIAS *et al.*, 2001; KOPF; GORETZKI; HENDRIK, 2001). Recentemente, o uso do mitotano foi avaliado, após a ressecção de tumores (KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; VASSIPOULOU-SELLIN *et al.*, 1993; VASSIPOULOU-SELLIN *et al.*, 2001), mas pouco se sabe sobre as vantagens reais nestes casos. O emprego de mitotano pode ser mantido enquanto houver evidências de redução do tamanho do tumor e o paciente puder suportar as reações adversas (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004). Na literatura, não se encontra uma indicação formal ou um consenso sobre a duração do tratamento com mitotano (ILIAS *et al.*, 2001). No Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e no Hospital Erasto Gaertner – Liga Paranaense de Combate ao Câncer (HEG-LPCC), o mitotano é utilizado por um período mínimo de 18 meses, para pacientes em reincidência da doença, de acordo com a resposta clínica e as reações adversas.

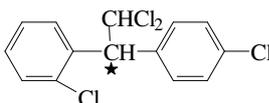


Figura 3.1. Estrutura química do mitotano. O carbono identificado com ★ é quiral.

Fonte: FANG, 1979.

O mitotano, de nome comercial: Lisodren, é produzido pela *Bristol-Myers Squibb* e comercializado na forma de comprimidos contendo 500 mg de princípio ativo. O fabricante do mitotano recomenda, sem especificar a idade do paciente, que o tratamento seja iniciado com doses de 2 a 6 g/dia, divididas em 3 a 4 tomadas, elevando até 9 a 10 g/dia,

dependendo da resposta clínica e dos efeitos adversos (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004).

Devido a sua característica lipofílica, inicialmente o mitotano se acumula em tecido adiposo e aparece em baixas concentrações no sangue (TERZOLO *et al.*, 2000), podendo ser necessários vários meses para a saturação da gordura. Este fármaco atravessa a barreira hemato-encefálica (BOLLEN; LANSER, 1992), depositando-se no tecido gorduroso cerebral.

Após a administração oral de mitotano, apenas 60% da dose é absorvida, e desta parte 20-30 % é armazenada nos tecidos, principalmente adiposo. Uma concentração plasmática máxima é obtida em três a cinco horas e um equilíbrio de mitotano entre o plasma e os tecidos é alcançado em 12 horas (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004). O cloreto do ácido o,p'-diclorodifenilacético (o,p' DDA), um derivado do mitotano, é o responsável pela ação terapêutica (CAI *et al.*, 1995).

Abraham *et al.* (2002) perceberam que, após a administração de mitotano por tempo prolongado, pequenas doses diárias são suficientes para manter as concentrações plasmáticas entre 10 e 20 µg/mL; segundo estes autores, alguns pacientes necessitam de apenas 0,5 g a 1 g de mitotano. Doses menores reduzem significativamente as reações adversas, tornam os tratamentos mais toleráveis e reduzem as interrupções e cessações. Schteingart; Tsao e Taylor (1980), Dickstein *et al.* (1998) e Terzolo *et al.* (2000) sugeriram que esquemas terapêuticos com baixas doses de mitotano, mantidos por longos períodos, podem ser viáveis e podem trazer melhoras à qualidade de vida do paciente, com minimização dos efeitos adversos e maior adesão ao tratamento.

O mitotano causa atrofia citotóxica das células das glândulas adrenais, normais e neoplásicas, em parte através da destruição de mitocôndrias (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004). Para produzir efeitos terapêuticos, o mitotano necessita ser metabolizado (SCHTEINGART, 2000; REIF *et al.*, 1974; CAI *et al.*, 1995). Os efeitos produzidos pelo mitotano nas espécies animais variam em função do metabolismo deste fármaco.

Doses de mitotano de 6 a 10g/dia causam reações adversas gastrointestinais em 80% e disfunção neuromuscular e sintomas psiquiátricos em 40% dos pacientes (HUTCHISON; SHAHAN; DRUGDEX, 2004; BOOLEN; LANSER, 1992). Em 1992, Bollen e Lanser afirmaram que os distúrbios neurológicos causados pela terapia com mitotano parecem envolver o córtex cerebral e o cerebelo, dependem da relação entre a concentração cerebral de mitotano e a sua concentração sanguínea e são reversíveis. Estas manifestações geralmente estão associadas a concentrações plasmáticas superiores a 20 µg/mL (HEILMANN *et al.*, 2001; BOOLEN; LANSER, 1992; MOOLENAR *et al.*, 1981) e dificultam a adesão ao tratamento, freqüentemente exigindo redução da dose de mitotano e/ou interrupção da terapêutica, o que compromete grandemente a adesão do paciente ao tratamento e, conseqüentemente, o sucesso terapêutico.

Os relatos da literatura sobre a eficácia e a utilidade do mitotano são controversos e de difícil comparação entre si. Vários fatores contribuem com esta situação, sendo os mais importantes:

1) Existência de poucos estudos controlados, randomizados, com número significativo de pacientes, avaliando o emprego do mitotano. Isto ocorre porque o CAC é raro e extremamente agressivo. A maior parte das publicações sobre CAC é brasileira.

2) Diversidade de esquemas posológicos para mitotano utilizados em adultos e ausência de consenso de posologia para crianças; variação no tempo de uso do mitotano e na dose total acumulada; dose necessária à saturação dos tecidos para cada paciente.

3) Variações nas características clínicas dos pacientes, sendo as principais: diferenças entre adulto e criança, estadios do CAC, cirurgias para ressecção de massa tumoral primária ou metástases, manifestações hormonais distintas.

4) Deve-se destacar que vários dos estudos que falharam em demonstrar resposta tumoral objetiva ao mitotano não verificaram se as concentrações plasmáticas estavam na faixa considerada terapêutica (14 a 20 µg/mL). Além disso, não está determinada a relação existente entre a dose de mitotano e a sua concentração no sangue.

Devido à impossibilidade de se prever a habilidade de cada paciente (ou de cada tumor) em responder ao mitotano, a maioria dos pesquisadores ainda recomenda seu uso apenas nos casos de CAC não passíveis de ressecção, em terapias prolongadas e para os pacientes com respostas clínicas claras (AHLMAN *et al.*, 2001).

Portanto, a influência da quiralidade da molécula sobre seu efeito farmacológico ainda não foi estudada. Não existem também informações sobre os aspectos estereoquímicos da metabolização do mitotano. Como ocorre para outros medicamentos, é possível que exista diferença farmacológica entre os enantiômeros. Uma forma de verificar esta hipótese é determinar a proporção entre os enantiômeros no plasma dos pacientes. A separação dos enantiômeros do mitotano será, portanto, de fundamental interesse para o estudo da sua ação farmacológica.

De acordo com Buser e Muller (1995) o o,p'-diclorodifenildicloroetano apresenta a configuração S (-)-o,p'-diclorodifenildicloroetano e R (+)-o,p'-diclorodifenildicloroetano.

3.2. Cromatografia Líquida Quiral

3.2.1. Fundamentos

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Essa migração resulta de diferenças de equilíbrio dos analitos e é determinada por fatores que afetam esse equilíbrio como: composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura de separação. A principal diferença entre cromatografia líquida clássica e a de alta eficiência é que esta utiliza fases estacionárias compostas de micropartículas. Na cromatografia no modo normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel e a

retenção aumenta com o decréscimo da polaridade na fase móvel (CASS; DEGANI, 2001). A Figura 3.2 ilustra os componentes fundamentais de um equipamento para HPLC.

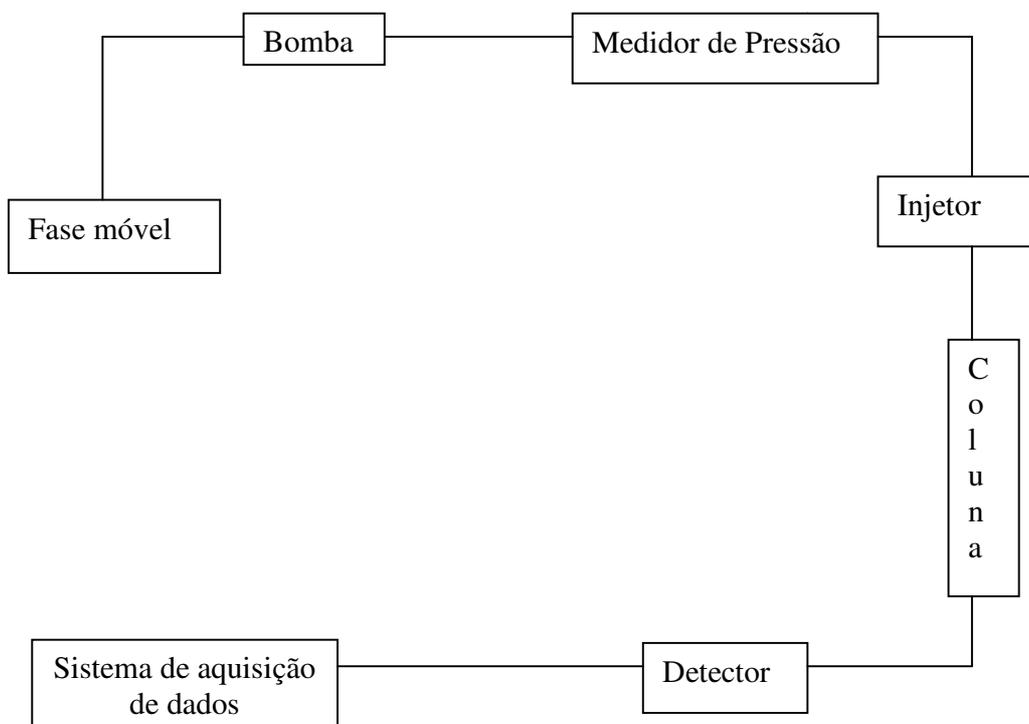


Figura 3.2. Esquema de um equipamento de HPLC.

Os parâmetros cromatográficos são úteis para a avaliação da eficiência da separação na coluna cromatográfica, fornecendo informações referentes ao comportamento do composto com a fase móvel e estacionária. A seguir serão descritos alguns dos principais parâmetros utilizados em separações.

O tempo de retenção de um composto, definido por $t_{R,i}$, em cromatografia é característico da substância analisada em uma determinada condição. O fator de retenção, k_i , é a razão entre a quantidade de substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel, e pode ser definido por:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (3.1)$$

onde t_M é o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária.

O valor de k_i não deve ser muito pequeno, pois significa que o composto pouco interage com a fase estacionária, nem muito grande, por causar alargamento dos picos. Um k_i muito pequeno (menor que 1) significa que o soluto tem pouca interação com a fase estacionária, enquanto que um k_i muito grande (maiores que 5) significa o soluto tem muita afinidade com a fase estacionária.

Cada prato corresponde a uma etapa de equilíbrio do composto entre as duas fases, medindo a eficiência de separação através dos tempos de retenção e do alargamento dos picos. Ele pode ser calculado através da equação 3.2 onde w_b é a largura do pico na base e w_h é a largura de um pico a meia altura.

$$N = 16 \left(\frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_{R,i}}{w_h} \right)^2 \quad (3.2)$$

N caracteriza a eficiência da coluna, ele aumenta com um melhor enchimento, com aumento do tamanho da coluna e otimização da vazão da fase móvel. O valor de N , em termos de ordem de grandeza, pode ser considerado constante para uma coluna particular. Para fases estacionárias com partículas de tamanho diferente, as de menor tamanho podem ser mais eficientes apresentando um maior valor de N , porém essa diferença praticamente desaparece ao aumentar-se a quantidade de amostra na coluna.

A altura equivalente a um prato (H) é a correlação entre o tamanho da coluna (L) e o número de pratos (N). Baixos valores da H são relacionados a utilização de colunas de partículas pequenas, vazões de fase móvel baixas, altas temperaturas de separação e

separação de pequenas concentrações de amostra. N é aproximadamente constante para diferentes picos em um cromatograma para uma determinada condição de operação, sendo que a largura dos picos aumentará proporcionalmente com o tempo de retenção.

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.3)$$

O fator de assimetria dos picos (As_{10}) está relacionado com os mecanismos de retenção, a incompatibilidade da amostra com a fase móvel e/ou estacionária e a existência de volume morto no topo da coluna.

$$As_{10} = \frac{b}{a} \quad (3.4)$$

onde a corresponde a 10% da altura do pico na primeira metade do pico e b a 10% na outra metade, isso pode ser melhor visualizado na Figura 3.3. A assimetria dos picos aumenta com o aumento da carga na coluna, esta perda de simetria é mais drástica para colunas mais eficientes (com partículas de menor tamanho).

O fator de separação (α) mede a seletividade da separação para dois picos adjacentes, sendo a relação entre seus fatores de retenção (k_i).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

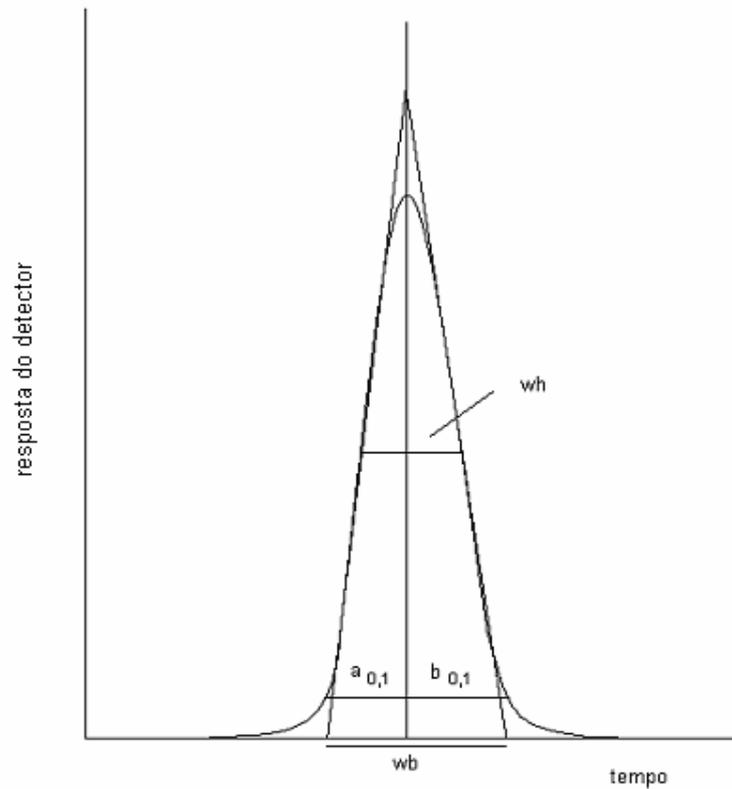


Figura 3.3. Relação entre largura de um pico na base, a meia altura, a e b a 10%.

A resolução (R_s) mede a qualidade de separação, levando em conta as larguras dos picos e seus respectivos tempos de retenção.

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (3.6)$$

A resolução é dependente do k , do N e do α . O valor de k pode ser alterado pelo ajuste da fase móvel. Se numa determinada situação tem-se um baixo valor de α , a resolução pode ser aumentada pela incorporação de mais pratos. Um aumento no valor de

α , com a finalidade de um aumento na resolução, pode ser atingido mudando-se a fase móvel, esta deve ter a mesma polaridade para não interferir no valor de k_i , porém deve produzir interações diferentes entre o soluto e a fase estacionária (MEYER, 1996). A resolução pode ser otimizada pela mudança da fase móvel, taxa de vazão e temperatura.

A relação entre eficiência do solvente determinada pela separação dos centros dos picos e a eficiência da coluna representada pelo alargamento dos picos mostra que quando ambos são bons o resultado é uma boa separação dos dois componentes e os tamanhos dos picos são estreitos (HAMILTON; SEWELL, 1978).

Quando um soluto passa através da coluna de separação, a largura dos picos aumenta e o soluto é diluído pela fase móvel. Há três contribuições para o alargamento dos picos: difusão turbilhonar, difusão molecular (geralmente de pouca importância para cromatografia líquida) e transferência de massa (HAMILTON; SEWELL, 1978). A seguir serão descritas essas contribuições.

A fase fluida move mais lentamente nas partes estreitas e mais rapidamente nas mais largas, uma molécula pode ter sua velocidade variada através do leito fixo. A teoria da difusão molecular assume que as moléculas percorrem determinados caminhos. Porém, elas podem se difundir lateralmente de um caminho para outro, nos quais a velocidade pode ser diferente. Esses dois acontecimentos resultam em um aumento do alargamento dos picos e na diminuição da eficiência.

A difusão na direção do fluxo (difusão molecular longitudinal) na fase fluída é importante para o alargamento dos picos em cromatografia gasosa, porém na maior parte dos casos não é significativa em cromatografia líquida.

A taxa que o soluto é transferido para a fase estacionária influencia no alargamento dos picos e na eficiência, essa taxa depende de cinéticas de adsorção e dessorção. Se a superfície sólida onde ocorrem esses mecanismos não é homogênea, ela aumentará o alargamento dos picos.

Outro mecanismo que pode se observar é referente ao movimento das moléculas em diferentes velocidades, dependendo se estão perto da superfície de alguma partícula ou

não. Pode se observar um perfil de velocidade e isso acarreta no alargamento dos picos. Quando a fase estacionária é porosa, o volume intrapartícula é preenchido com fase móvel estagnada. As moléculas que difundem em uma pequena distância no poro, rapidamente voltam para a corrente principal, enquanto que as que difundem a uma distância maior, levam mais tempo no poro, o que acarreta no alargamento dos picos.

3.2.2. Aspectos Gerais

A diferença entre a cromatografia analítica e a preparativa está relacionada com o objetivo químico. A cromatografia analítica tem como alvo a separação de misturas complexas para identificação e quantificação dos componentes, uma vez que os sinais requeridos são adquiridos para um componente, este é descartado. O objetivo é a rápida determinação da estrutura do componente, através da aquisição direta de informação apropriada e o cálculo de sua concentração, através de uma calibração do sinal do detector. A cromatografia preparativa tem como objetivo a isolamento de uma certa quantidade de um componente puro e seu uso posterior (GUIOCHON, 2002).

A cromatografia enantiosseletiva que emprega fases estacionárias quirais tem se tornado uma das técnicas mais importantes para a determinação da pureza ótica de moléculas orgânicas. O método é constantemente aplicado com objetivos analítico, mas a separação cromatográfica de enantiômeros em escala preparativa tem sido considerada uma boa alternativa para o fornecimento de enantiômeros puros de compostos bioativos. A cromatografia em escala preparativa tem sido importante para a aceitação da tecnologia em escala industrial devido a introdução da tecnologia de leito móvel simulado (LMS) (FRANCOTTE, 2001).

A obtenção de enantiômeros puros segue duas abordagens. A primeira, abordagem quiral, consiste na realização de sínteses enantiosseletivas para a produção do enantiômero desejado. Esta abordagem inclui sínteses que usam enzimas, catalisadores estereoseletivos, entre outros. A segunda, abordagem racêmica, implica na preparação do

racemato a qual é separado em seus enantiômeros. Esta preparação é usualmente alcançada por uma seqüência de reações a qual geralmente apresenta um grau de dificuldade menor que a forma de ativos óticos. Nesta abordagem os enantiômeros são obtidos através da separação dos diastereoisômeros (cristalização, cromatografia) ou pela separação de seus enantiômeros por cromatografia que utiliza fases estacionárias quirais. A cromatografia geralmente fornece os dois enantiômeros com alta pureza, o que é muito importante para comparações preliminares de testes biológicos com os dois enantiômeros (FRANCOTTE, 2001).

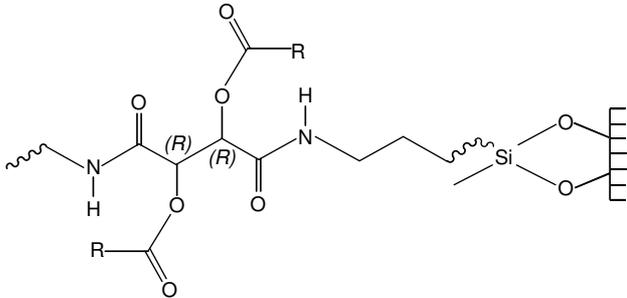
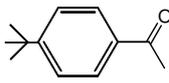
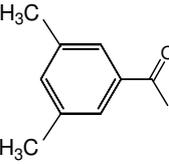
Atualmente várias fases estacionárias quirais estão disponíveis para separações preparativas enantiosseletivas, tais como fases baseadas em celulose e amilose desenvolvidas por Okamoto (Chiralcel e Chiralpak), em poliacrilamidas (Chiraspher), dialiltartaramidas (Kromasil CHI) e ciclodextrinas (FRANCOTTE, 2001).

Uma fase estacionária quiral consiste de uma matriz aquiral, por exemplo, sílica porosa, com ligantes quirais unidos quimicamente ou dinamicamente (fisicamente). Esses ligantes podem ser substâncias, tais como fases Pirkle, ciclodextrinas, entre outros. Os ligantes quirais podem também ser macromoléculas, tais como derivados de celulose, glicopeptídios macrocíclicos ou proteínas imobilizadas. Kromasil CHI é uma nova FEQ (fase estacionária quiral) que consiste de uma rede de polímeros que incorpora um seletor quiral C_2 simétrico bifuncional, o monômero O,O'-diaróil-N, N'-dialil-L-tartardiamida, o polímero é ligado covalentemente a sílica funcional. O seletor quiral é unido à rede de polímeros por reação de ligação cruzada, a qual também causa ligação covalente a sílica funcionalizada. Suas estruturas são mostradas na Tabela 3.1. Como essas fases são ligadas por ligações cruzadas e normais a sílica gel, elas são insolúveis em solventes orgânicos e não há limitação com respeito a escolha da fase móvel. Fases normais, reversas e condições de fluídos supercríticos têm sido aplicadas. Elas apresentam uma boa estabilidade mecânica, mas o conteúdo relativamente alto de sílica gel aquiral nessas FEQ reduz sua capacidade de carga. Poucas separações preparativas nessas duas FEQ têm sido relatadas (LINDHOLM; FORNSTEDT, 2005; FRANCOTTE, 2005).

O tamanho das partículas da FEQ é muito importante porque controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Quanto maior

o tamanho da partícula porosa, mais lento será o processo de difusão e, como consequência, mais lenta será a transferência de massas do analito entre a fase estacionária e a móvel. Conforme diminui o tamanho das partículas, a profundidade dos poros diminui também, e a saída das moléculas dos poros ocorre mais rapidamente, permitindo a obtenção de análises rápidas sem perda de eficiência (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Tabela 3.1. Estrutura química das FEQs baseadas em tartardiamida.

ESTRUTURA QUÍMICA	R	NOME COMERCIAL
		Kromasil CHI-TBB
		Kromasil CHI-DMB

Fonte: FRANCOTTE, 2005.

A escolha da fase móvel é muito importante, pois influencia a seletividade da separação, tempo de retenção, solubilidade do racemato e resolução, como mencionado anteriormente. Em condições normais da fase cromatográfica, a redução no tempo de retenção é geralmente atingida pelo aumento de modificadores polares, tais como metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, acetato de etila, dioxano, entre outros. Entretanto, não é possível prever como essas mudanças afetam a resolução e a seletividade. A possibilidade de controlar o tempo de retenção tem se tornado extremamente importante com a introdução da tecnologia de leito móvel simulado, a qual é mais eficiente em termos de rendimento quando ciclos pequenos de tempos são aplicados. Em muitos casos a mudança na sua composição pode causar inversão da ordem de eluição. Um outro aspecto relacionado a fase móvel é a solubilidade da mistura racêmica, porém para seletores quirais

quimicamente ligados a carregadores insolúveis (sílica gel), não há uma limitação muito grande e a seletividade é o fator que governa essa escolha (FRANCOTTE, 2001).

Andersson, Balmér e Persson (1999) estudaram a influência da composição da fase móvel na retenção, enantiosseletividade e resolução dos enantiômeros do ácido racemotóxico usando Kromasil-CHI-TBB como fase estacionária quiral. Os resultados mostraram que a adição de alguns modificadores influenciava nesses parâmetros. A fase móvel era composta de hexano, ao acrescentar um modificador o tempo de retenção era diminuído. O menor tempo conseguido foi utilizando-se 2-propanol, seguido de acetato de etila, éter metil *tert* butílico (MTBE) e diclorometano. A adição de acetato de etila resultou numa alta enantiosseletividade e eficiência (maiores valores de número de pratos).

Weng *et al.* (2004) estudaram a separação enantiomérica de aminoácidos derivatizados usando uma FEQ contendo rede de polímero imobilizado, derivado do ácido L-tartárico (Kromasil CHI-DMB). Eles verificaram que o fator de retenção e separação eram altos quando um álcool mais ramificado era usado como modificador polar, devido a duas razões: a interação da FEQ com o álcool linear é mais forte que com o álcool ramificado; o álcool linear é apto a submeter-se a associações OH-OH para formar tetrâmeros cíclicos, os quais ocupam as cavidades quirais. Para esse tipo de FEQ, interações de ligações de hidrogênio são os fatores mais importantes de separação. Quando um álcool linear é usado a interação de ligações de hidrogênio competitiva é forte então os fatores de retenção e separação são todos baixos. Além disso, quando a concentração diminui, a interação de ligações de hidrogênio competitiva diminui também, então α e k aumentam. Outro fenômeno observado é que os valores de α aumentam em geral quando o número de carbonos no álcool linear aumenta.

Lowendahl e Allenmark (1997) estudaram a separação enantiomérica de vários compostos cíclicos de sulfóximidás e seus precursores sulfóxidos em FEQ N,N'-Dialil-L-tartardiamida, Kromasil CHI-DMB e Kromasil CHI-TBB. A fase móvel em estudo era composta por hexano, contendo 2-propanol (2-15%) e MTBE (20-60%) como modificadores. A substituição de 2-propanol por MTBE produziu aumento na seletividade para ambas as FEQ. Comparando as duas fases móveis, constituídas por quantidades comparáveis de respectivo modificador em hexano com respeito a força da mistura de

solvente binária, pode se perceber que o 2-propanol é mais forte na quebra de interações de ligações de hidrogênio entre o analito e a FEQ. Em ambas as FEQ alta retenção e baixa eficiência da coluna foram observadas quando MTBE foi usado como modificador ao invés do 2-propanol.

A separação de compostos quirais por cromatografia líquida de alta eficiência é feita por meios de métodos direto e indireto, envolvendo a formação de derivados diastereoisoméricos. O procedimento indireto baseia-se na formação prévia de diastereoisômeros com reagentes quirais opticamente puros, os quais, por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes, podem ser separados empregando-se fases estacionárias não quirais (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A metodologia que se tem tornada mais atrativa para separação de enantiômeros é a direta, ela é possível desde que haja reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral. Este seletor deve se associar preferencialmente a um dos enantiômeros. O mecanismo de separação está fundamentado na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros, sendo um dos critérios mais importantes para a separação. As diferenças de estabilidade destes complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna, quanto maior a diferença maior é a separação. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro. A diferença de energia livre de formação dos adsorbatos diastereoisoméricos formados deve ter um valor satisfatório para que ocorra separação. A retenção e a eficiência observada de uma FEQ são a soma de todas as interações entre os solutos e a FEQ (CASS; DEGANI, 2001; ANDERSSON; ALLENMARK, 2002; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; AHUJA, 1990).

Não há dúvidas que a cromatografia pode ser uma técnica importante para a obtenção de compostos opticamente puros. Em escala laboratorial esse método é rápido, fácil, geralmente aplicável e fornece ambos enantiômeros. Em escala piloto e de processo essa abordagem permite assegurar um contínuo suprimento das substâncias puras em quantidades requeridas para o desenvolvimento de investigações biológicas. Até mesmo em escala de produção, especialmente com a introdução da tecnologia de leito móvel simulado,

a cromatografia pode ser considerada uma das possíveis abordagens para se obter enantiômeros puros (FRANCOTTE, 2001).

3.3. Método dos Momentos

A análise dos momentos é uma ferramenta útil para determinação de coeficientes de difusão axial e difusividades efetiva nos poros através de experimentos de pulsos. Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta a um pulso de concentração do soluto na entrada do leito. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma linha reta (Lei de Henry). A inclinação da curva pode ser determinada pelo primeiro momento através de um pulso do soluto, o qual é associado com o seu tempo de retenção. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos através do segundo momento (CREMASCO *et al.*, 2001).

O balanço diferencial de massa para um componente *i* em uma fatia da coluna é dado por:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + F \frac{\partial q}{\partial t} + u_o \frac{\partial c_i}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} \quad (3.7)$$

onde c_i e q são as concentrações do componente *i* na fase móvel e estacionária, respectivamente, F é a razão de fase e é igual a $(1-\varepsilon)/\varepsilon$, onde ε é a porosidade da coluna, u_o a velocidade intersticial da fase móvel, D_L o coeficiente de dispersão axial, o qual é a soma dos coeficientes de difusão molecular e turbilhonar, e z e t as coordenadas espaciais e de tempo. Na derivação da equação foi assumido que: enchimento é homogêneo, a compressibilidade da fase móvel é desprezada, e assim a velocidade da fase móvel e o

coeficiente de dispersão axial são constantes ao longo da coluna, o leito é isotérmico e há homogeneidade radial da coluna (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998; MIYABE; GUIOCHON, 1999).

No modelo de força linear do filme sólido, a resistência a transferência de massa (coeficiente de transferência de massa $k_{m,i}$) está localizada no filme sólido no qual a concentração da fase estacionária varia de uma concentração de equilíbrio q_i^* para uma concentração média na superfície de contato com a fase estacionária q . Quando a taxa de transferência de massa é proporcional a diferença de concentração, ela pode ser escrita como (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998; MICHEL; EPPING; JUPKE, 2005):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_{m,i} (q_i^* - q) \quad (3.8)$$

Na região diluída, isoterma linear é usada (cinética de adsorção/dessorção infinitamente rápida):

$$q_i^* = K_i c_i \quad (3.9)$$

ou

$$q^* = [\varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) H_i] c_i \quad (3.10)$$

onde K_i é a constante de equilíbrio, H_i a constante da Lei de Henry para um composto i e ε_p a porosidade da partícula.

Os três diferentes tipos de porosidades, que são a porosidade total (ε_T) a porosidade do leito (ε) e a da partícula (ε_p) são relacionadas por (LAI; LIN, 1999):

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \varepsilon_p \quad (3.11)$$

A hidrodinâmica de uma coluna cromatográfica pode ser descrita através da análise da distribuição residência-tempo do eluente. As propriedades que incluem parâmetros de equilíbrio e transferência de massa podem ser obtidas de vários métodos: solução no domínio do tempo, solução do domínio de Laplace, solução no domínio de Fourier e método dos momentos (DUAN; CHING; SWARUP, 1998).

A análise do método dos momentos é geralmente usada para determinar a hidrodinâmica da coluna, como já tido anteriormente. O n th momento de um perfil de um pico na saída da coluna cromatográfica de $z = L$ é definido como (DUAN; CHING; SWARUP, 1998; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994):

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, z = L) t^n dt \quad (3.12)$$

O n momento absoluto ou normalizado é:

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (3.13)$$

e o nth momento central é:

$$\mu_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (3.14)$$

As expressões de altura de pratos são estritamente aplicáveis somente quando fortes interações biológicas não estão presentes, como no estudo da contribuição de transferência de massa para alargamento dos picos, ou quando as interações são muito fracas e podem ser descritas adequadamente por isotermas de equilíbrio linear (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b).

Expressões para alturas de pratos podem ser obtidas pela solução de equações parciais diferenciais que governam o movimento das espécies adsorventes através da coluna. O conjunto de equações que descrevem a conservação de massa em um leito recheado, o equilíbrio entre soluto e sorvente, e os efeitos de não equilíbrio de dispersão axial, difusão na direção axial e transferência de massa dentro das partículas são resolvidas no domínio de Laplace da resposta da coluna devido a um pulso. É possível derivar essa solução da expressão transformada para momentos estatísticos da saída de picos. O primeiro momento absoluto, μ_1 , é relacionado a retenção do pico e assim a força de ligação (constantes de equilíbrio). O segundo momento central, μ_2 , é relacionado ao espalhamento de pico causado por distanciamento do equilíbrio. Quando o pico é gaussiano, μ_2 é igual a σ^2 (variância) (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b).

Assume-se, como um modelo cinético, o modelo linear de filme sólido e que as cinéticas de adsorção/dessorção são infinitamente rápidas (equação 3.9).

Devido a sua grande significância física, o primeiro momento é normalmente definido como momento normalizado e momentos maiores que o primeiro são definidos como centrais, os quais são medidos relativamente pelo primeiro (WANG; CHING, 2002; ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b).

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L)t dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (3.15)$$

$$\overline{\mu_2} = \sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L)(t - \mu_1)^2 dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (3.16)$$

Por definição, o momento zero de um perfil de concentração de um pico eluente é simplesmente a área do pico. O primeiro momento é o centro da gravidade do perfil de concentração. Em cromatografia, está relacionado com o tempo de retenção do pico e assim com a força de adsorção. Ele irá coincidir com o máximo pico somente quando este é simétrico. O segundo momento é a variação do pico, a qual está, cromatograficamente, relacionada ao espalhamento do pico, causada pela não linearidade das isotermas de adsorção e resistências a transferência de massa (WANG; CHING, 2002).

Para modelo de força linear de filme sólido, a expressão para o primeiro e segundo momento corresponde é (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998):

$$\mu_1 = \frac{L}{u_0} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] \quad (3.17)$$

$$\bar{\mu}_2 = \frac{2L}{u_0} \left\{ \frac{D_L}{u_0^2} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^2 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \right\} \quad (3.18)$$

A expressão para H como mencionado anteriormente foi derivada da análise dos momentos da solução do modelo geral de taxa no domínio de Laplace (WANG; CHING, 2002).

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2 L}{\mu_1^2} = \frac{2D_L}{u_0} + 2u_0 \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{k_m K} \left(1 + \frac{\varepsilon}{(1-\varepsilon)K} \right)^{-2} \quad (3.19)$$

que também pode ser escrita em termos da velocidade superficial da fase móvel (u) (DUAN; CHING; SWARUP, 1998; BOCKER *et al.*, 2002):

$$H = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^{-2} \quad (3.20)$$

onde:

$$K_i = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)H_i \quad (3.21)$$

$$H_i = \left(\frac{t_{R,i}}{t_M} - 1 \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \quad (3.22)$$

Essa equação contém dois parâmetros de interesse, o coeficiente de dispersão axial e o coeficiente global de transferência de massa. É evidente que as contribuições da dispersão axial e várias resistências de massa são aditivos lineares (WANG; CHING, 2002).

Quando um fluido passa por um leito recheado, há uma tendência para o aparecimento de misturas axiais, a qual reduz a eficiência de separação. O princípio do alargamento dos picos de origem cinético inclui difusão molecular, difusão turbilhonar e resistência à transferência de massa e taxa finita de cinéticas de adsorção/dessorção. Então, é importante o estudo da difusão no meio poroso. Ruthven (1984) aponta que as taxas de adsorção e dessorção em adsorventes porosos são geralmente controladas por taxa de difusão dentro da rede porosa, mais do que pelas cinéticas de adsorção/dessorção. Isso é especialmente verdade em cromatografia, na qual os adsorventes são preparados cuidadosamente, então eles exibem uma energia moderadamente forte de absorção física e nenhuma absorção química. Em um leito recheado, é impossível para a fase móvel mover a uma grande distância através de uma linha reta sem atingir a superfície da partícula. Os canais seguem caminhos tortuosos em volta das partículas. Todos os fenômenos que contribuem para mistura axial, exceto os de resistência à transferência de massa, são agrupados no coeficiente de dispersão axial. Os dois principais mecanismos que contribuem para dispersão axial são difusão molecular e difusão turbilhonar. Numa primeira aproximação, suas contribuições são aditivas, e o coeficiente de dispersão axial D_L é dado por (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998; RUTHVEN, 1984; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994):

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (3.23)$$

onde d_p é o diâmetro da partícula, D_m é a difusividade molecular, e γ_1 e γ_2 são constantes geométricas, que possuem valores próximos a 0,7 e 0,5, respectivamente. Para enantioseparações de substâncias quirais que possuem propriedades físicas idênticas (incluindo coeficiente de difusão D_m), seus D_L são valores bem próximos.

Como já mencionado, as cinéticas de adsorção/dessorção são infinitamente rápidas, a isoterma é linear quando as equações (3.17) e (3.18) são usadas para avaliar o primeiro e segundo momentos. Assim, todos experimentos de pulsos precisam ser realizados sob condições lineares, então isotermas de equilíbrio lineares podem ser assumidas sob essas condições (DUAN; CHING; SWARUP, 1998).

Para um sistema líquido, as difusividades moleculares dos líquidos são muito pequenas para contribuir significativamente para dispersão axial. No modelo linear de filme sólido, o coeficiente global de transferência de massa inclui contribuições da resistência de transferência de massa devido à difusão através das fronteiras da camada entre a fase móvel que flui em volta do material que recheia a coluna e a fase móvel estagnada dentro dessas partículas. A dispersão axial pode ser escrita como (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998; RUTHVEN, 1984):

$$D_L = \gamma_2 d_p u \quad (3.24)$$

H é uma função da coluna e da geometria de enchimento, condição de operação, propriedades do soluto e interações do soluto com a fase móvel e a fase estacionária. Para uma dada separação na qual o sistema (o enchimento e o soluto) é definido, H é uma função da velocidade da fase móvel (u). Uma das funções mais usadas é a equação de van Deemter

(ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; BONATO, 2006):

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (3.25)$$

O primeiro e segundo termos incluem os efeitos de difusão molecular na direção axial e difusão turbilhonar, enquanto que o terceiro termo considera as contribuições da transferência de massa do filme que flui e cinéticas lentas de adsorção.

Nesse caso os valores de A, B e C são:

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (3.26)$$

$$B = 2\gamma_1 D_m \quad (3.27)$$

$$C = 2 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^{-2} \quad (3.28)$$

Os três termos, presentes na Figura 3.4, descrevem diferentes efeitos que precisam ser levados em conta ao selecionar a fase estacionária na cromatografia preparativa. O termo A, o qual é praticamente constante por toda variação de velocidade, é principalmente governado pela difusão turbilhonar. Ele refere-se ao alargamento dos picos devido a diferentes caminhos seguidos pelas moléculas da amostra. Isso resulta das imperfeições de

enchimento bem como adsorventes com distribuição de tamanho de partículas muito variados. A altura absoluta do termo A é proporcional ao diâmetro médio da partícula. A altura do prato pode então ser diminuída pelo uso de partículas menores (SCHULTE; EPPING, 2005; BONATO, 2006).

O aumento linear da altura do prato a altas velocidades é sumarizado no termo C ($C u$). Este é causado pelo aumento da influência da resistência a transferência de massa a altas velocidades. A resistência à transferência de massa, especialmente dentro dos poros, é quase independente da velocidade do fluido. Entretanto, se a velocidade do fluido aumenta, a relação entre transporte convectivo axial na fase móvel na coluna e a transferência de massa dentro e na fase estacionária domina. A inclinação do termo C depende da natureza do material de enchimento. Quanto mais otimizado o sorvente em termos da acessibilidade dos poros e comprimento dos caminhos de difusão menor a inclinação de C e maior a eficiência da coluna a velocidade da fase móvel elevadas (SCHULTE; EPPING, 2005).

O termo hiperbólico B (B/u) expressa a influência da difusão axial das moléculas de soluto na fase móvel. Isto pode ser observado em sistemas preparativos com sorventes com diâmetros grandes operados a baixas taxas de vazões. Em muitos casos de cromatografia preparativa ele pode ser omitido, quando a velocidade da fase móvel é particularmente alta. Quando a difusão longitudinal depende do coeficiente de difusão do soluto, o termo pode ser influenciado pela mudança da composição da fase móvel. Para se atingir altos coeficientes de difusão solventes com baixas viscosidades são escolhidos, o qual resultam em pequenas quedas de pressão e então são favoráveis (SCHULTE; EPPING, 2005).

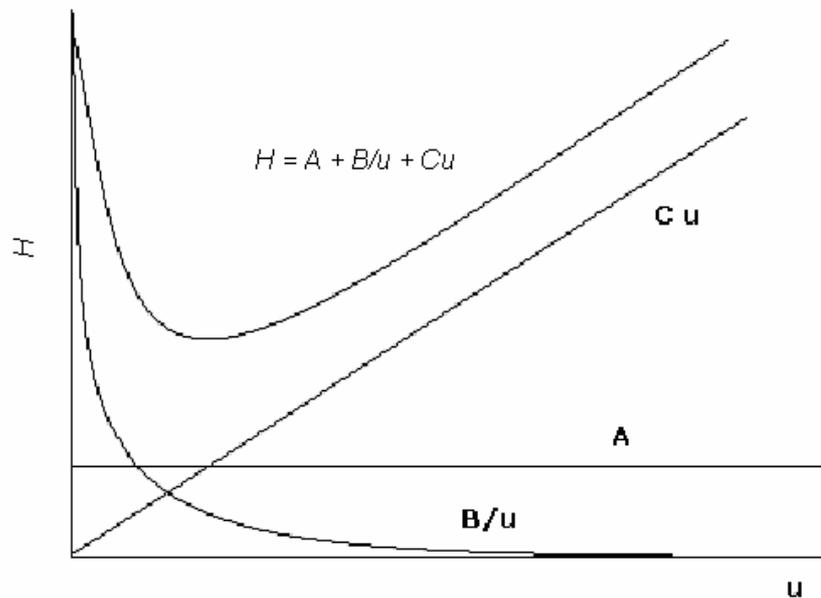


Figura 3.4. Relação entre H e velocidade da fase móvel (u).

Para traçadores não adsorventes ($K=0$), se os poros não são maiores que o traçador, a entrada do traçador dentro da partícula é impedida. A inclinação do gráfico do primeiro momento em função de L/u será a porosidade do leito. Quando uma espécie que adsorve entra na coluna a inclinação do gráfico do primeiro momento aumenta, essa diferença é atribuída ao tempo adicional que o soluto gasta na fase estacionária (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985a).

Um sistema cromatográfico bem projetado minimiza os efeitos de mistura das tubulações, válvulas e conexões, estes causam alargamento dos picos. A vazão precisa ser igualmente distribuída em todo o leito da entrada até a saída. Pequenas bolhas, obstruções causadas por material particulado ou projeções ruins podem prejudicar a separação aumentando o valor de H (ARNOLD; BLANCH; WILKE 1985a).

3.4. Análise Termodinâmica

A temperatura é um dos parâmetros básicos que influencia a retenção, seletividade e resolução de uma separação cromatográfica, por isso a temperatura da coluna é geralmente otimizada. Baixas temperaturas em cromatografia líquida com FEQ podem ser essenciais se isso permitir a separação dos enantiômeros. As dependências dos logaritmos naturais dos fatores de retenção e seletividade com o inverso da temperatura são rotinamente usadas para determinar dados termodinâmicos que caracterizam a separação de enantiômeros e permitem os estudos de alguns aspectos de processo de reconhecimento quiral. As diferentes interações dos enantiômeros e a FEQ podem contribuir para a discriminação quiral, o tamanho e a configuração geométrica dos solutos podem ser significantes também. Separações de enantiosseletividade são geralmente mais influenciadas pela temperatura do que separações não quirais (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2004).

Geralmente um aumento na temperatura de trabalho da coluna produz ao mesmo tempo uma diminuição nos tempos de retenção dos solutos associado com um aumento na eficiência dos picos (aumento do número de pratos). A viscosidade da fase móvel também diminui, assim é possível trabalhar a altas vazões, além disso, a diminuição no tempo de retenção do soluto pode ser observada quando se tem alta força de eluição, então é possível trabalhar com menores volumes de modificadores orgânicos na fase móvel (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

É geralmente aceitável que a enantioseparação cromatográfica direta é baseada na formação de diastereoméricos associados reversíveis que são criados por interações moleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. Este processo pode ser caracterizado por dados termodinâmicos usando a equação de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_i^0 = \Delta H_i^0 - T \Delta S_i^0 \quad (3.29)$$

onde ΔG_i^0 , ΔH_i^0 e ΔS_i^0 representam as diferenças na energia livre, na entalpia e na entropia de um enantiômero na fase estacionária e na fase móvel, respectivamente, R é a constante universal dos gases e T a temperatura em Kelvin (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004).

Considerando a troca do soluto entre a fase móvel e a estacionária, ΔG^0 , a mudança da energia livre de Gibbs na transferência de fase do soluto também pode ser expressa por:

$$\Delta G_i^0 = -RT \ln\left(\frac{k_i}{\Phi}\right) \quad (3.30)$$

onde k_i é o fator de retenção do soluto e Φ é a razão de fase da coluna (volume da fase líquida por volume do seletor quiral contendo a fase estacionária) (BERTHOD; HE; BESSLEY, 2004).

Expressando a energia de Gibbs usando mudança de entalpia, ΔH^0 e entropia, ΔS^0 , a relação entre os parâmetros cromatográficos e os termodinâmicos é apresentada a seguir WENG *et al.*, 2005; WENG *et al.*, 2004; BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004; DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004).

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \frac{\Delta S_i^0}{R} + \ln \Phi = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \Delta S_i^* \quad (3.31)$$

O gráfico de $\ln k_i$ em função de $1/T$ é linear com a inclinação de $-\Delta H_i^0/R$ e intersecção de $\Delta S_i^0/R + \ln \Phi$, se ΔH_i^0 é invariante com a temperatura. Isso simplifica a determinação dos valores de ΔH_i^0 e ΔS_i^0 dos solutos em um sistema cromatográfico.

Gráficos não lineares são, entretanto, geralmente observados quando a superfície da fase estacionária é heterogênea e a retenção do soluto é influenciada por mecanismos de retenção misturados, ou se há mudanças adaptáveis na fase estacionária com a temperatura. O cálculo de ΔS_i^0 na intersecção com o eixo y, entretanto, requer que a razão de fase da coluna seja conhecida (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004; HAROUN *et al.*, 2004).

No caso de separações quirais, o α é um parâmetro importante para a medida da diferença relativa de retenção entre dois enantiômeros. A transferência global de fases dos enantiômeros é composta por partes aquiral e quiral. O último, $\Delta\Delta G^0$, é responsável pela retenção mais elevada do segundo enantiômero produzido pela FEQ.

$$-\Delta\Delta G^0 = RT \ln \alpha = RT \ln \frac{k_R}{k_S} \quad (3.32)$$

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta\Delta S^0}{R} \quad (3.33)$$

$\Delta\Delta G^0$, $\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$ representam as diferenças de ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 para um dado par de enantiômeros respectivamente. Em HPLC, a enantioseparação é mais influenciada pelo termo entálpico em muitos casos, isso porque o experimento é geralmente realizado a temperaturas relativamente baixas. A interação dos enantiômeros com o sistema cromatográfico conduz a valores negativos de $\Delta\Delta H_{R,S}^0$ e $\Delta\Delta S_{R,S}^0$. Como esses parâmetros termodinâmicos são facilmente acessíveis, eles são frequentemente usados para fornecer informação do sistema de separação. Se a dependência de $\ln\alpha$ em função de $1/T$ é linear com inclinação $\Delta\Delta H_{R,S}^0/R$ e com intersecção $\Delta\Delta S_{R,S}^0/R$, então pode-se assumir que: ΔH_i e ΔS_i são independentes da temperatura; os enantiômeros interagem com o seletor quiral por mecanismos associativos simples; equilíbrio de solvatação-dessolvatação não obscura o

processo de associação dos enantiômeros com a FEQ (WENG *et al.*, 2005; WENG *et al.*, 2004; BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004; DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004).

Ao considerar um par de enantiômeros, a interação soluto-solvente na fase móvel é exatamente a mesma para ambos enantiômeros, assim, as propriedades termodinâmicas diferenciais do par reflete somente a diferença de interações na FEQ entre os dois enantiômeros (KANG; KO; CHEONG, 2004).

A equação 3.33 mostra que α pode ser afetado por mudanças na temperatura especialmente em situações em que a entropia domina o processo. A enantioresolução é geralmente melhor a temperaturas mais baixas, mesmo os tempos de retenção sendo maiores e a eficiência do pico menor (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

Um gráfico linear de van't Hoff sugere que a conformação da fase estacionária é rígida e o mecanismo de reconhecimento quiral permanece sem mudanças na faixa de temperatura experimental, assim mudanças estruturais induzidas pela temperatura produzem um gráfico não linear (WENG *et al.*, 2005; BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004; MORIN *et al.*, 1998).

Para valores de $\Delta\Delta H^\circ$ e $\Delta\Delta S^\circ$ negativos isso significa que a enantioseparação é geralmente controlada entalpicamente. O enantiômero mais retido tem interações mais fortes com a fase estacionária do que o primeiro. O valor negativo da entropia é causado principalmente pela perda de graus de liberdade do enantiômero mais retido, o que é desfavorável para o reconhecimento quiral. Com respeito aos valores de $\Delta\Delta H^\circ$, diferentes tipos de interação responsáveis pela discriminação quiral podem ser estabelecidas, os valores de ΔH° refletem as interações de um enantiômero com a FEQ. Quando maior o tamanho da molécula do soluto e menor o número de interações, mais fracas são as interações. Interações simultâneas envolvendo mais de dois grupos funcionais são provavelmente favoráveis para interações moleculares e reconhecimento quiral. A composição da fase móvel tem um efeito crítico nos mecanismos de interações do soluto com a fase estacionária, o que é evidenciado pelos parâmetros termodinâmicos. O valor de

α depende do valor de $\Delta\Delta G^0$, ele irá aumentar com a temperatura somente se a contribuição da entalpia é positiva ($\Delta\Delta H^0$) (WENG *et al.*, 2005; BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

A baixas temperaturas, a separação é controlada pelo termo entálpico, $\Delta\Delta H^0_{R,S}$ é expressa pela diminuição na seletividade com o aumento da temperatura, ou seja, enantiosseletividade, expressa por $\Delta\Delta G_{R,S}$ é principalmente influenciado por $\Delta\Delta H_{R,S}$ a baixas temperaturas. Com o aumento da temperatura, o termo entálpico será mais e mais compensado por $T\Delta\Delta S_{R,S}$. A uma certa temperatura (temperatura isoenantiosseletiva, T_{iso}) $\Delta\Delta G_{R,S} = 0$ e os enantiômeros não são separados ($\alpha=1$). Acima da T_{iso} , a ordem de eluição dos enantiômeros pode ser mudada e a enantiosseletividade é predominantemente influenciada pelo termo entrópico. Esta temperatura, conhecida como temperatura enantiosseletiva, pode ser calculada por:

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H^0_{R,S}}{\Delta\Delta S^0_{R,S}} \quad (3.34)$$

Por definição, os picos se sobrepõem completamente nessa temperatura e a ordem de eluição dos enantiômeros é mudada nas temperaturas menores e maiores que T_{iso} . Quando $\Delta\Delta H_{R,S}^0 > \Delta\Delta S_{R,S}^0$ a separação é dirigida entalpicamente (ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004; DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; SCHLAUCH; FRAHM, 2001; WENG *et al.*, 2004).

O estudo referente à compensação entalpia-entropia é comumente usado em cromatografia para a investigação de mecanismos de retenção do ponto de vista termodinâmico. Esse estudo é demonstrado por uma correlação linear entre ΔH^0 e ΔS^0 . A inclinação da reta é chamada de temperatura de compensação (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

$$\Delta H_i^0 = T_c \Delta S_i^0 + \Delta G_{T_c}^0 \quad (3.35)$$

onde $\Delta G_{T_c}^0$ é a energia molar padrão de Gibbs a qual caracteriza as interações globais dos enantiômeros em um sistema cromatográfico na temperatura de compensação, T_c (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004).

Nesta temperatura, todos os componentes tem a mesma mudança na energia livre, ΔG_{T_c} , e todos os componentes terão a mesma rede de retenção. Assim, a compensação entalpia-entropia pode ser usada para agrupar componentes com interações globais iguais na temperatura de compensação, apesar das suas dependências com as temperaturas serem diferentes. As mudanças na entalpia são compensadas pelas de entropia (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004; BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004; ROJKOVICOVÁ *et al.*, 2004).

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H_i^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_c} \right) - \frac{\Delta G_{T_c}^0}{T_c R} + \ln \Phi \quad (3.36)$$

A equação 3.36 mostra que o gráfico de $\ln k_i$ em função de ΔH_i^0 pode ser usado para determinar a temperatura de compensação. A similaridade da temperatura de compensação para uma família de solutos sugere que eles são retidos por interações essencialmente equivalentes (DUNGELOVÁ *et al.*, 2004).

A influência da temperatura na ordem de eluição tem sido documentada. Uma mudança na ordem de eluição foi prevista por Koppenhofer e Bayer baseada nas considerações termodinâmicas e mais tarde observado experimentalmente por Schurig e Watabe em cromatografia gasosa e por Pirkle em cromatografia líquida de alta eficiência. É geralmente aceitável que a inversão da ordem de eluição requer pelo menos dois grupos ligantes da fase estacionária com propriedades diferentes. As FEQ descritas na literatura abrangem estruturas complexas, tais como derivados de celulose ou baseadas em proteínas. Entretanto, Pirkle e Murray mostraram que esse fenômeno também ocorre com FEQ com estruturas menos complexas (KUSTERS; SPONDLIN, 1996; SCHLAUCH; FRAHM, 2001).

Weng *et al.* (2005) concluíram em um estudo termodinâmico usando quatro aminoácidos derivativos e dois compostos binaftil separados em coluna do tipo Kromasil CHI-DMB, que a transição dos valores de ΔH^0 e $\Delta\Delta H^0$ na condição de polaridade baixa do eluente é resultado de mudanças da conformação da FEQ. Quando a quantidade do álcool diminui, a conformação da FEQ muda levando a mudanças nas interações.

Weng *et al.* (2004) estudaram a separação enantiomérica de aminoácidos derivatizados usando uma FEQ contendo rede de polímero imobilizado derivado do ácido L-tartárico (Kromasil CHI-DMB). Eles verificaram que para alguns componentes os valores absolutos de $\Delta\Delta H$ eram maiores que para outros compostos, o que mostra que interações associadas com a enantiosseletividade entre os primeiros e a FEQ são altas. Os valores absolutos de $\Delta\Delta S$ de alguns componentes também foram maiores que para outros, indicando que a perda de graus de liberdade do enantiômero mais retido foi mais proeminente.

Kang, Ko e Cheong (2004) estudaram parâmetros termodinâmicos na separação de ketofren, fenoprofen e ibuprofen utilizando coluna Chirex 3001 com variação da composição da fase móvel (metanol e água). O valor da transferência de entalpia do soluto da fase móvel para a fase estacionária se tornou menos negativo quando a quantidade de metanol na fase móvel aumentou. Observaram também que ΔS_i^0 se tornava menos negativa quando o conteúdo de solvente orgânico aumentava. A entropia do soluto na fase estacionária é mais negativa do que na fase móvel (ΔS_i^0 é negativo) e é independente da composição da fase móvel. Assim, ΔS_i^0 é afetado tanto pela entropia do soluto na fase móvel como mudanças de entropia na fase móvel. Todos os solutos eram mais solúveis no metanol. Assim, a entropia do soluto em um solvente com alta quantidade de metanol será maior, o que produz valores de ΔS_i^0 mais negativos quando há um aumento da quantidade de metanol. As mudanças de ΔS_i^0 com respeito a composição da fase móvel pode ser baseada na mudanças de entropia relacionadas a fase móvel.

A retenção e a resolução dos enantiômeros aumenta com o decréscimo da quantidade de modificadores e os enantiômeros podem não eluir da coluna se a polaridade da fase móvel é muito baixa, os modificadores competem com os solutos por interações com a FEQ. As polaridades e viscosidades dos álcoois podem não ser os únicos fatores que

influenciam a separação quiral e a estrutura dos álcoois também pode ter algum efeito na estereosseletividade. A retenção diminui quando a temperatura aumenta, e a resolução se torna menor em altas temperaturas. Baixas temperaturas são desejáveis porque geralmente diferentes interações entre os enantiômeros e a FEQ ocorrem em temperaturas menores (WANG *et al.*, 2004).

Durante a enantioseparação de racematos em FEQ, uma diminuição da enantioseletividade em altas temperaturas é geralmente observada visto que muitas separações são entalpicamente controladas. Davankov foi o primeiro a relatar uma melhora na enantioseletividade ao elevar-se à temperatura da coluna ao separar N-benzilprolina recêmico em uma coluna de troca de L-prolina incorporado a uma resina. Foi determinado que a contribuição da entropia domina a contribuição da entalpia para todas as faixas de temperaturas estudadas. Apesar da enantioseparação em FEQ ser um processo de rotina, somente poucos estudos têm demonstrado aumento na enantioseletividade a altas temperaturas. Tal comportamento foi relatado por Isaksson na separação de propranolol em celulose imobilizada, por Cabrera na enantioseparação de Prominal em ChiraDex, e por Kusters e Spondlin na separação de 4-hidroxifenilmetil-sulfóxido em Chiracel-OB (KUSTERS; SPONDLIN, 1996).

Kusters e Spondlin (1996) estudaram a influência da temperatura na enantioseparação do rolipram e racematos estruturalmente relacionados em Chiracel-OD e verificaram que para alguns racematos a seletividade diminuía com o aumento da temperatura, para outros ela aumentava com o aumento da temperatura e para alguns nenhuma influência da temperatura era observada. Mudança na temperatura influenciava diferentemente a interação do enantiômero com a FEQ.

Como já tido anteriormente o reconhecimento quiral pode ser atingido por diferentes tipos de ligações entre os enantiômeros e as FEQ, tais como ligações de hidrogênio, interações do tipo π - π e interações dipolo-dipolo. A estrutura química do mitotano apresenta átomos de cloro como um átomo eletronegativo ao longo de dois anéis aromáticos. Assim, a separação pode ocorrer devido a diferentes ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo entre os átomos de cloro e a fase estacionária. Interações do tipo π - π

entre os substituintes do fenil e os anéis aromáticos dos analitos exercem uma importante função nos mecanismo de reconhecimento quiral (ALI; ABOUL-ENEIN 2002).

3.5. Isotermas

Aumento de escala em HPLC preparativa tem se tornado o método preferido para separação e purificação de enantiômeros. Esse método é caro, entretanto, os fatores de separação são usualmente pequenos ou moderados. Assim, a otimização por computador das condições experimentais sobre como operar o processo de separação pode reduzir significativamente o dinheiro e tempo. Isso requer a determinação de propriedades físico-químicas do sistema de fase selecionado. Os dados de isoterma de adsorção são usados para calcular a separação sob condições de sobrecarga (CAVAZZINI *et al.*, 2002).

Uma simulação adequada de um processo de separação cromatográfica requer principalmente informação de como os componentes de uma mistura a serem separados são distribuídos, sob condições de equilíbrio, entre a fase móvel e a estacionária. Dependendo da combinação específica das duas fases, vários mecanismos são explorados para resolver um problema concreto de separação. Muito freqüentemente, o enriquecimento específico de componentes que estão dissolvidos na superfície da fase sólida estacionária é o mecanismo principal, ou seja, mecanismo de adsorção e análise do equilíbrio de adsorção. O equilíbrio do processo de adsorção é geralmente apresentado usando dependências da quantidade de adsorvato na composição da fase fluída para uma temperatura constante. Em geral isothermas de adsorção podem ser determinadas somente experimentalmente. Nas últimas décadas, nenhum progresso significativo foi alcançado com respeito à medida da quantidade de adsorvato para substituir as considerações convencionais de balanço para ter acesso a essas quantidades (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001).

Conhecimento do comportamento da isoterma geralmente contribui para a explicação de mecanismo de retenção e pode ajudar a sugerir abordagens para a melhora da separação e até mesmo da taxa de produção. Devido ao comportamento de altas concentrações, a maioria dos sistemas de separação é não linear, separações preparativas

são muito trabalhosas de serem projetadas. Como a natureza não linear da cromatografia preparativa é governada por isotermas de equilíbrio, como já mencionado anteriormente, a determinação experimental de isotermas de adsorção é importante no projeto de novos métodos em cromatografia preparativa (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003).

Em condições de sobrecarga a isoterma de adsorção tem uma influência significativa na velocidade de propagação de uma frente de concentração em colunas cromatográficas e então nos tempos de retenção e formas dos perfis de eluição (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

A isoterma é a propriedade termodinâmica fundamental a qual precisa ser medida para permitir predição precisa de perfis de picos individuais em cromatografia não linear. Como isso é comumente realizado, o uso de modelos e facilidades computacionais disponíveis podem permitir consideráveis economias na otimização de novas separações. Muitos métodos tradicionais têm sido usados para determinar isotermas: os métodos estatísticos, consomem períodos de tempo longos e requerem quantidades consideráveis de reagentes químicos e solventes; o método de pulso, é impraticável para muitos componentes orgânicos, porque algumas moléculas são difíceis e caras para serem sintetizadas; o método de onda simples, pode ser usado somente para determinação de isotermas competitivas em casos nos quais o desvio do modelo de Langmuir é moderado. Outra abordagem de grande interesse em determinar isotermas competitivas é o método da composição de velocidade, apresentado por Helfferich, o qual é baseado na teoria de cromatografia de multicomponente. A desvantagem desse método é que ele é aplicável somente para isotermas do tipo Langmuir ou adsorção estequiométrica (SUN *et al.*, 2001).

Os modelos de isotermas de equilíbrio de adsorção relacionam a composição de duas fases em equilíbrio, modelos lineares são válidos somente sob condições experimentais usadas em baixas concentrações. Para atingir taxas de produções econômicas, entretanto, a cromatografia preparativa deve ser conduzida a concentrações altas, nas quais as isotermas são raramente lineares. Quando as soluções contêm vários sorvatos a uma concentração suficientemente alta, eles influenciam mutuamente na adsorção um do outro e as isotermas obtidas sob tais condições são chamadas de

competitivas. Porém, quando somente um adsorvato está presente ou as concentrações das soluções são muito baixas, efeitos mútuos não são manifestados, isotermas não competitivas das espécies individuais caracterizam a adsorção (JACOBSON; JONH; HORVÁTH, 1987; MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

Muitos estudos têm sido feitos sobre a origem cinética do aparecimento de caudas dos picos cromatográficos em cromatografia linear. A altos valores de coeficientes de taxa de cinética de transferência de massa, a eficiência da coluna é alta e controlada essencialmente por dispersão axial (difusão axial e turbilhonar). Quando a taxa cinética diminui, a eficiência da coluna diminui, os perfis se tornam mais curtos, mas permanecem simétricos enquanto a taxa for pequena. Há o aparecimento de caudas quando o inverso de tempo morto não é tão pequeno comparado a essa taxa. Entretanto, quanto mais baixas forem as cinéticas de transferência de massa mais simétricos serão os picos, com uma coluna de altura considerável e baixas vazões de fase móvel. Entretanto, em cinéticas mais rápidas, as caudas podem aparecer se a coluna for pequena e as vazões forem altas. A intensidade do efeito depende também do fator de retenção do pico (FORNSTEDT; SAJONZ; GUIOCHON, 1998).

Muitos métodos estáticos e dinâmicos têm sido descritos para determinação de isotermas de equilíbrio para componentes puros e isotermas competitivas para misturas binárias e mais complexas. O princípio essencial desses métodos consiste na medida da concentração ou quantidade de componentes na fase estacionária em equilíbrio com uma solução de composição conhecida usada como fase móvel. Nos métodos estáticos, a quantidade adsorvida na FEQ no equilíbrio é pesada diretamente ou indiretamente e a operação é repetida com o aumento da concentração da solução. Se exato esses métodos, entretanto, são demorados e consomem grandes quantidades de amostra. Devido à transferência de massa entre as fases ser necessariamente rápida em sistemas cromatográficos, métodos dinâmicos são preferidos (MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

Os métodos dinâmicos para determinação de isotermas são baseados na análise matemática das curvas de resposta correspondente às mudanças bem definidas da concentração de alimentação da coluna. Muitos métodos dinâmicos estão disponíveis para determinar isotermas de equilíbrio por cromatografia, os mais comuns são análise frontal,

eluição por pontos característicos, análise frontal por pontos característicos e os métodos de perturbação, entre outros. Para isotermas de componentes únicos, o método dinâmico foi introduzido por Glueckauf. Eles são rápidos e necessitam de menores quantidade de amostra que os métodos estáticos, um dos métodos dinâmicos mais conhecidos é o da análise frontal. Ele relaciona o ponto da isoterma a uma certa concentração da fase móvel ao tempo de eluição da curva de ruptura do soluto a essa concentração (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; MIHLBACHLER *et al.*, 2002; ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON., 2003).

A determinação de isotermas por análise frontal é justamente o problema inverso comparado a predição de curvas de ruptura de isotermas conhecidas. A teoria de equilíbrio fornece ferramentas para prever características de tais curvas (concentração no platô intermediário e tempo de retenção nas frentes de eluição) somente esses dados precisam ser determinados experimentalmente para resolver esse problema inverso. Para determinar a isoterma sucessivas mudanças na entrada da coluna precisam ser realizadas e as curvas de ruptura resultantes têm que ser analisadas (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001).

A maioria dos métodos experimentais para determinação de isotermas de adsorção conta com a análise de dados primários na teoria de equilíbrio clássica de cromatografia. O conceito geral é baseado na consideração de que há somente convecção e distribuição de equilíbrio entre as duas fases em um leito fixo, efeitos cinéticos que causam alargamento dos picos são desconsiderados. Assim, esse conceito é geralmente chamado de modelo ideal. O formato dos perfis de eluição e das curvas de ruptura preditas pela teoria do equilíbrio é diretamente relacionado ao curso das isotermas de adsorção. Pode-se também resolver o problema inverso consistindo na determinação das isotermas através das medidas de perfis de eluição e curvas de ruptura (LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001).

Um dos métodos mais comumente usados para medir isotermas é a análise frontal, também chamado de método de balanço de massa. Há duas principais variantes desse método, o método da escadaria e do pulso retangular. No primeiro, duas soluções são misturadas na corrente de entrada da coluna e bombeadas a uma velocidade constante, a

primeira solução é a fase móvel pura a segunda é uma solução de mistura de dois componentes dissolvidos na fase móvel. A concentração total desses dois componentes é aumentada gradativamente, em tempos apropriados, e uma composição relativa constante da mistura. Vários conjuntos de dados são sucessivamente adquiridos a diferentes concentrações dos componentes. Um segundo sistema de HPLC precisa ser usado para analisar periodicamente o efluente da coluna. O segundo método ou método do pulso retangular é uma variação desse primeiro. Ele consiste na injeção, em um único degrau, lavagem da solução da coluna com fase móvel pura após a eluição de primeiro degrau estar completa e reinício com um novo degrau com concentração mais alta. Apesar de tempos mais altos se comparado ao método que utiliza escadas de concentração, essa abordagem evita a necessidade da análise da composição nos platôs intermediários, em um segundo sistema de HPLC (SUN *et al.*, 2001; BURGER *et al.*, 2000).

A Figura 3.5 apresenta o cromatograma da análise frontal quando a concentração do soluto varia de c_a para c_b , as quais são as concentrações no eluente no início e no final, respectivamente. A amostra é introduzida em $t = 0$ e o equilíbrio é alcançado em $t = t_b$. O balanço global de massa da coluna entre $t = 0$ e $t = t_b$, pode ser expresso por:

$$\int_0^{t_b} (c_b - c_{sai}) Q dt = V_D (c_b - c_a) + V_{ads} (q'_b - q'_a) \quad (3.37)$$

onde c_{sai} é a concentração na saída, q'_a e q'_b são as concentrações na superfície em equilíbrio com as concentrações de soluto c_a e c_b , respectivamente; Q é a vazão volumétrica de eluente, V_D é o volume morto do sistema, e V_{ads} é o volume de adsorvente da FEQ na coluna (excluindo o volume dos poros). Se V_T é o volume da coluna, V_D e V_{ads} podem ser calculados por $V_D = V_T \varepsilon_T$ e $V_{ads} = V_T (1 - \varepsilon_T)$, respectivamente. Quando a área acima sombreada é aproximadamente igual à área de um retângulo na mesma variação de concentração e com tempo de $t = 0$ a $t = t_r$, a equação pode ser simplificada por:

$$V_r (c_b - c_a) = V_D (c_b - c_a) + V_{ads} (q'_b - q'_a) \quad (3.38)$$

onde V_r é o volume médio de retenção da frente correspondente a concentração c_b , o qual pode ser calculado por $V_r = Qt_r$, com t_r sendo o tempo de retenção médio correspondente, pode-se deixar a unidade de q ser por unidade de adsorvente incluindo os poros, $q = q'(1 - \varepsilon_p)$ (LAI; LIN, 1999).

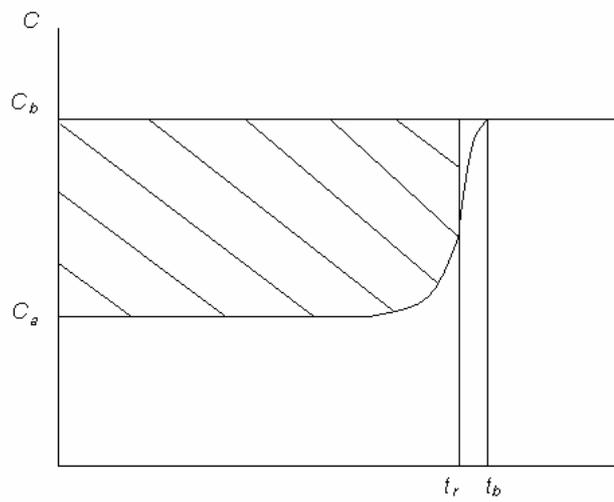


Figura 3.5. Ilustração de um cromatograma usado no cálculo da concentração de equilíbrio na superfície.

Para cada degrau de concentração da solução binária que entra na coluna, considerando a abordagem de pulso retangular, dois degraus de concentração são obtidos no perfil de eluição. Um platô de concentração segue cada degrau. No primeiro desses dois platôs, as concentrações dos dois enantiômeros no eluente são diferentes daquelas da solução bombeada na coluna, no segundo platô a composição do eluente é a mesma que a solução bombeada na coluna. O primeiro é composto, geralmente, somente pelo menos

retido e o segundo por ambos enantiômeros e suas concentrações são as mesmas da amostra injetada. Para derivar a quantidade de cada componente adsorvido no equilíbrio é preciso determinar a concentração dos dois componentes nos platôs. As isotermas são determinadas a partir do tempo de retenção das duas frentes e a composição dos platôs intermediários, aplicando um balanço de massa. Então, cada degrau no aumento da concentração da mistura binária fornece um ponto da isoterma para cada componente. A Figura 3.6 ilustra um cromatograma frontal de uma mistura binária e mostra as duas frentes distintas que resulta quando um passo de concentração de uma mistura binária passa através da coluna. Inicialmente a coluna é equilibrada com uma solução na qual a concentração do componente 1 e 2 são $c_{1,a}$ e $c_{2,a}$, respectivamente. Em $t = 0$ essas concentrações são aumentadas para $c_{1,b}$ e $c_{2,b}$ e quando passam pela coluna, essa mudança promove a elevação de duas frentes com volumes de retenção V_1 e V_2 . Os volumes de retenção são aproximados com os pontos de inflexão da curva. Na zona entre as duas frentes, as concentrações são $c_{1,m}$ e $c_{2,m}$. O balanço de massa fornece a quantidade q_i , na superfície em equilíbrio com $c_{1,b}$ e $c_{2,b}$:

$$q_i = \frac{(V_2 - V_D)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_2 - V_1)(c_{i,m} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad (3.39)$$

onde q_i é expressa em base de volume por unidade de adsorvente. Uma série de experimentos pode ser feita para sistemas binários a diferentes concentrações e q_i é avaliada, desses dados obtém-se a isoterma de adsorção. Desde que somente o componente menos retido está presente durante a eluição do platô intermediário, $c_{i,m}$ é derivado diretamente da altura desse platô (JACOBSON; JONH; HORVÁTH, 1987; MIHLBACHLER *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2001; BURGER *et al.*, 2000; SUFANG *et al.*, 2001).

Comparando com o método de análise frontal de escadaria, a instrumentação é mais simples, as medidas são mais precisas desde que eles contam com a determinação da concentração no platô intermediário e do tempo de retenção das duas frentes, e esses dados

são mais precisos que a medida da concentração relativa. Suas desvantagens são que ele requer altos tempos e grandes quantidades de componentes para os quais as isotermas são requeridas. A largura do platô intermediário diminui com o aumento dos dois componentes na fase móvel (SUN *et al.*, 2001; BURGER *et al.*, 2000).

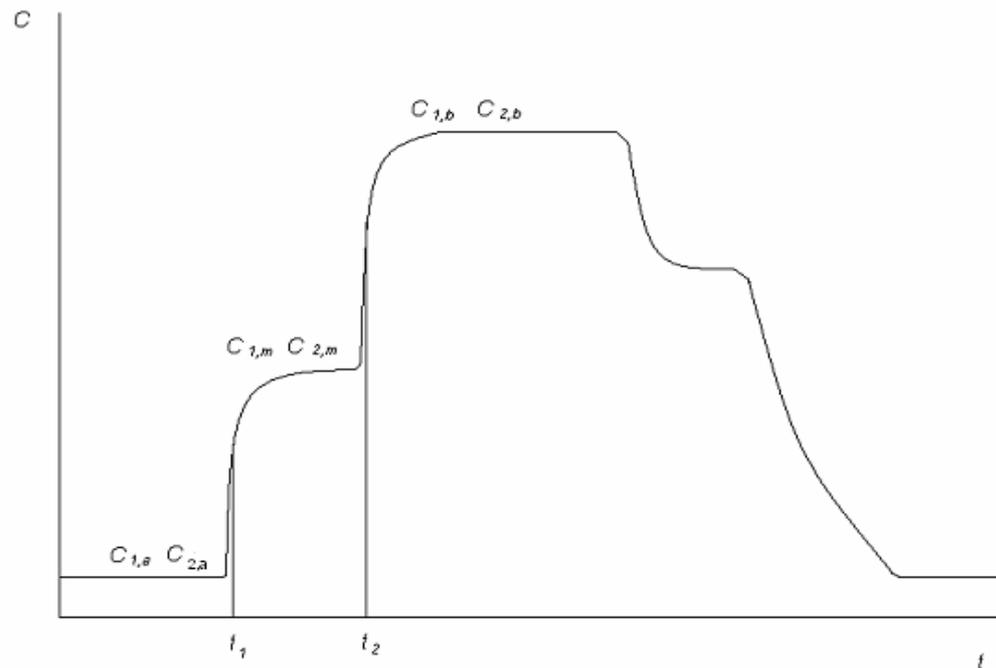


Figura 3.6. Perfil de concentração no eluente após um degrau de concentração de uma solução binária.

Uma isoterma de adsorção é a razão entre a concentração de equilíbrio de um componente na fase estacionária e na fase móvel a uma temperatura constante. A equação de Langmuir é o modelo mais simples para uma isoterma não linear. Ela pode ser usada para adsorção de componentes em superfícies homogêneas a concentrações baixas e moderadas. O modelo é expresso pela equação clássica:

$$q_i = \frac{a_i c_i}{1 + b_i c_i} = \frac{b_i q_{s,i} c_i}{1 + b_i c_i} \quad (3.40)$$

onde q é a concentração na fase estacionária em equilíbrio com a concentração na fase móvel c , parâmetro b , constante de equilíbrio por unidade de área de superfície e b é então relacionado a energia de adsorção; a capacidade da monocamada ou capacidade de saturação específica da fase estacionária é $q_s = a/b$, $a_i = b_i q_{s,i}$ é a constante de equilíbrio a diluição infinita que pode ser expresso por:

$$a_i = K_{0,i} = \frac{dq_i}{dc_i} \text{ quando } c \rightarrow 0 \quad (3.41)$$

onde $K_{0,i}$ é a constante de equilíbrio da partícula no domínio da lei de Henry (GOTMAR; ALBAREDA; FORNSTEDT, 2002; LAI; LIN, 1999; LINDHOLM; FORNSTEDT, 2005; JACOBSON; JONH; HORVÁTH, 1987; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; GUIOCHON, 2002).

3.6. Condições de Sobrecarga

3.6.1. Cromatografia em Batelada

Para a otimização da taxa de separação de uma determinada substância em uma coluna preparativa é necessário o conhecimento das condições de sobrecarga da coluna. Em colunas analíticas o volume de injeção não deve ultrapassar o valor de 1% do volume da

coluna. Entretanto, em escala preparativa essa limitação não ocorre devido à elevada taxa de separação requerida para essas colunas. Uma coluna cromatográfica pode atingir a condição de sobrecarga quando: a amostra é pouco solúvel na fase móvel ou o volume de injeção é elevado para as dimensões da coluna; alta concentração da amostra e amostras que não são dissolvidas em solventes com elevada característica de solvatação quando comparada à fase móvel. (ROSA, 2005).

Quando a sobrecarga da coluna é considerada, dois procedimentos podem ser realizados. O primeiro, sobrecarga de concentração, considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com o aumento da concentração da solução injetada é esperado que os picos cromatográficos sejam muito distorcidos chegando a ter a forma de um triângulo. Pode ocorrer o aumento da cauda no pico cromatográfico. O segundo tipo de sobrecarga, sobrecarga de volume, considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. A partir de uma solução concentrada, preparada para faixa de solubilidade do analito na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico. O aumento do volume, dentre outros fatores como a força do solvente usado para diluição, pode resultar na deformação do pico. Os picos cromatográficos são mais assimétricos e a partir de um certo volume de injeção a altura do pico pode manter-se constante. (MARCHEREY-NAGEL, 2002).

A precisão da modelagem de processos de separação em batelada requer: um conjunto de equações de conservação de massa, condições iniciais e de limites apropriados que descrevam o processo exato implementado, isotermas de equilíbrio e um modelo adequado de cinética de transferência de massa. O processo cromatográfico é descrito por vários modelos de complexidade crescente. Os mais importantes desses modelos são os modelos de taxa geral, de difusão de poro agregado e de equilíbrio dispersivo, sendo o último o mais usado. O modelo de equilíbrio dispersivo é geralmente o mais usado quando as resistências a transferências de massa são pequenas. É correto quando a transferência de massa é controlada por difusão na fase móvel enquanto a troca dos eluentes entre a fase móvel e estacionária é rápida. Ele pode ser empregado para modelar muitas separações não lineares. Esse modelo assume que há um constante equilíbrio dos componentes de alimentação entre as duas fases do sistema cromatográfico e que a eficiência finita da

coluna usada pode ser considerada por contribuições adicionais para a dispersão axial. Há um equilíbrio instantâneo entre a fase estacionária e a fase móvel e usa-se um termo aparente de dispersão que considera a dispersão axial e a taxa finita da cinética de transferência de massa. Devido às colunas de HPLC modernas serem caracterizadas por altos valores de eficiência, esse modelo fornece resultados bons. Nesse caso, o coeficiente aparente de dispersão é independente da concentração do soluto em uma variação ampla de concentração e independente de sua natureza. Ele fornece resultados mais satisfatórios quando as resistências às transferências de massa são pequenas, as quais ocorrem geralmente no caso de separações de componentes com massa molar baixa. O balanço de massa desse modelo para um componente i é escrito como:

$$\frac{\partial c_i(z,t)}{\partial t} + F \frac{\partial q_i(z,t)}{\partial t} + u \frac{\partial c_i(z,t)}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c_i(z,t)}{\partial z^2} \quad (3.42)$$

onde q_i e c_i são as concentrações do componente i na fase estacionária e na fase móvel, respectivamente, t é o tempo e z a distância ao longo da coluna, $F = (1-\varepsilon)/\varepsilon$ é a razão de fase, com ε a porosidade da coluna, u é a velocidade da fase móvel e D_a o coeficiente de aparente de dispersão axial. Como o modelo de equilíbrio dispersivo assume equilíbrio instantâneo entre a fase estacionária e a móvel, a concentração na fase sólida q_i é derivada do modelo de isoterma de adsorção $q_i = f(c_1, c_2, \dots, c_n)$. As contribuições de resistências às transferências de massa estão incluídas no coeficiente aparente de dispersão. Esse coeficiente é relacionado à eficiência da coluna por: (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

$$D_a = \frac{uL}{2N} \quad (3.43)$$

onde L o comprimento da coluna, e N o número de pratos para um componente i . Na prática é assumido que todos os componente tem o mesmo número de pratos (ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON, 2003; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; GUIOCHON, 2002; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

O espalhamento dos picos observado em cromatografia preparativa é mais extensivo que em cromatografia linear. Isso é causado predominantemente por consequências de termodinâmicas não lineares, por exemplo, a concentração depende da velocidade associada a cada concentração. Quando a cinética de transferência de massa é rápida, a influência da dispersão axial aparente é pequena ou moderada e resulta em uma simples correção aos perfis de picos preditos por termodinâmica apenas. A solução de um sistema de equações diferenciais parciais requer um conjunto apropriado de condições iniciais e de limites. Esse conjunto de equações descreve em termos matemáticos o experimento que é realizado. Em eluição, a condição inicial da coluna é seu equilíbrio com a corrente de fase móvel pura, então:

$$c_i(t = 0, 0 < z < L) = 0 \quad (3.44)$$

Condições de limite na entrada da coluna

$$(t > 0 \text{ e } z = 0) c_i(t, 0) = c'_{f,i} + \frac{D_a}{u} \frac{\partial c_i}{\partial z} \Big|_{t, z=0} \quad (3.45)$$

onde $c'_{f,i}$ é definido por:

$$c'_{f,i} = c_{f,i} \text{ se } 0 < t < t_p \quad (3.46)$$

$$c'_{f,i} = 0 \text{ se } t_p < t \quad (3.47)$$

t_p sendo o tempo de injeção e o subscrito f indicando um valor de entrada.

Condições de limite para a saída da coluna: (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002; LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001).

$$(t > 0 \text{ e } z = L) \frac{\partial c_i}{\partial z} = 0 \quad (3.48)$$

O sistema de equações de balanço de massa com a equação apropriada das isotermas precisam ser integrados numericamente para obterem os perfis de concentração na saída da coluna. A validação de qualquer modelo de isoterma não linear requer uma comparação dos perfis de sobrecarga sob condições experimentais bem definidas e os perfis calculados com o modelo de isoterma sob as mesmas condições (FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002).

As variáveis desempenho para operações cromatográficas em batelada podem ser avaliadas através da produtividade e do consumo de dessorvente:

$$Prod = V_{inj} c_{alim,i} \text{ Recuperação} \quad (3.49)$$

$$\text{Consumo de dessorvente (CD)} = \frac{Q t_{op}}{\text{massa recuperada}} \quad (3.50)$$

onde t_{op} é o tempo de operação.

3.6.2. Leito Móvel Simulado

Cromatografia preparativa, em particular Leito Móvel Simulado (LMS), é atualmente uma das mais importantes técnicas de separação quiral na indústria farmacêutica (ZHANG; MAZZOTI; MORBIDELLI, 2004). Uma das principais características para o sucesso das técnicas cromatográficas, no que diz respeito à síntese assimétrica de enantiômeros puros em escala preparativa, é a possibilidade de desenvolver a separação em tempos relativamente curtos (FRANCOTTE *et al.*, 1998). A cromatografia em LMS permite a alimentação contínua e separação de misturas binárias, a simulação de um contato contracorrente entre as fases sólidas e líquidas maximiza o transporte de massa, levando a uma redução significativa no consumo de fases móvel e estacionária, maior produtividade, menor custo de operação e produtos mais concentrados (RODRIGUES; PAIS, 2004; SCHULTE; STRUBE, 2001).

Separações cromatográficas contínuas de químicos finos e enantiômeros podem ser realizadas através da tecnologia de LMS. A técnica de LMS envolve o contato contracorrente simulado entre a fase móvel e a fase estacionária. Isso pode ser realizado em unidades constituídas de um conjunto de colunas cromatográficas de leito fixo, através do movimento periódico de portas de entrada e de saída na mesma direção da vazão de fluido (MIGLIORINI, MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998). Unidades LMS exibem um número de vantagens com respeito à cromatografia preparativa de batelada. Em particular, isso é devido à natureza contínua da operação e um uso eficiente das fases móveis e estacionárias, o qual permite diminuir o dessorvente requerido e melhorar a produtividade

por unidade de tempo e massa da fase estacionária. Economia de solvente acima de 90% e aumento na produtividade têm sido reportados. Além disso, boas separações podem ser atingidas até mesmo a baixos valores de seletividade e com número de pratos relativamente baixos (MAZZOTI, STORTI; MORBIDELLI, 1997a).

A unidade de leito móvel simulado (LMS), como já citado, é um processo contínuo, no qual o princípio de operação pode ser descrito com referência a configuração equivalente contracorrente verdadeira (ou leito móvel verdadeiro). Essa é dividida em quatro seções, cada uma exerce um papel específico na separação. Especificamente, a zona ou seção entre a linha de eluente e a de extrato é referida como zona 1 e seu papel é dessorver o componente mais retido. Zona 2, entre a linha de extrato e de alimentação, tem o objetivo de dessorver o componente menos retido. O papel da zona 3, entre a linha de alimentação e refinado é adsorver o componente mais retido, enquanto que o papel da zona 4, entre a linha de refinado e eluente é adsorver o componente menos retido. Considerando a alimentação de uma mistura contendo os dois componentes a serem separados, o componente mais adsorvível denominado A, é coletado na corrente de extrato e o menos adsorvível, denominado B, é coletado na corrente de refinado. A separação é realizada nas duas seções centrais, na qual o componente A é conduzido para baixo para a saída de extrato e o componente B para cima para a saída de refinado, respectivamente. O dessorvente é alimentado na parte inferior da seção 1, assim como nessa seção o componente A elui e o sólido sorvente, que é reciclado no topo da seção 4, é regenerado. Finalmente o componente B é adsorvido na seção 4 da unidade, assim como nessa seção o dessorvente é regenerado, o qual é misturado a corrente de dessorvente e reciclado para coluna 1 (MAZZOTI, STORTI; MORBIDELLI, 1997a; MAZZOTI, STORTI; MORBIDELLI, 1997b; MIGLIORINI, MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998; LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2002). Esse processo pode ser melhor visualizado na Figura 3.7.

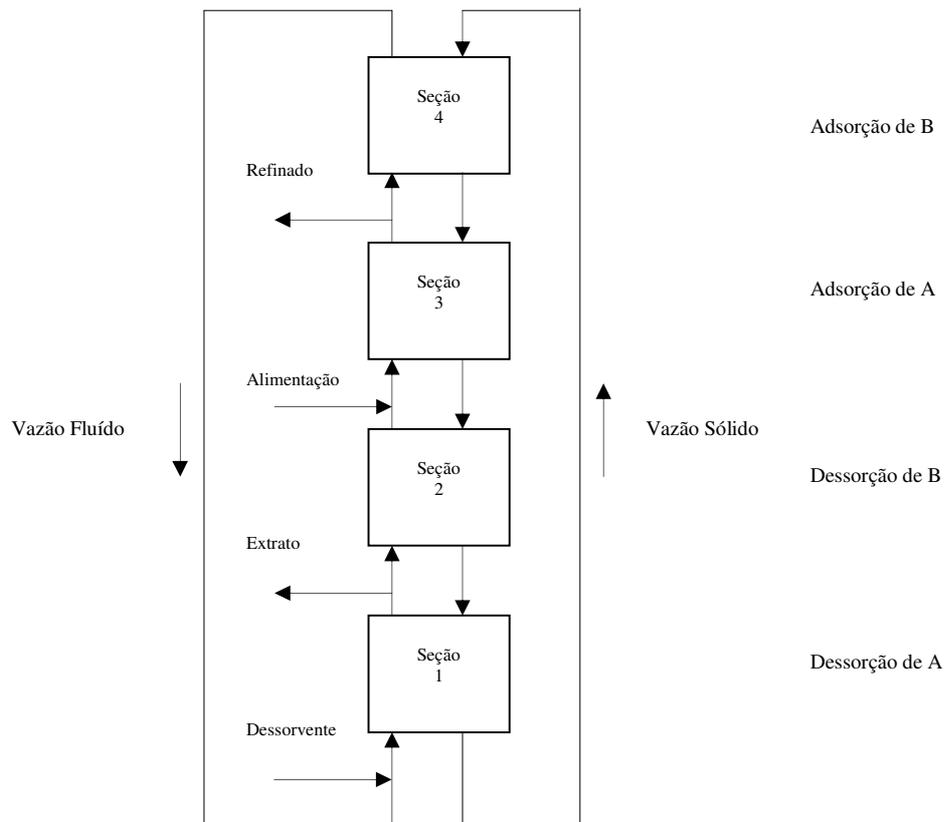


Figura 3.7. Esquema de uma unidade de quatro seções de contracorrente verdadeira para separação contínua: separação binária de um componente mais retido A e menos retido B.

Devido às ineficiências inevitáveis conectadas ao movimento da fase sólida, na prática a configuração contracorrente verdadeira é substituída pela configuração LMS. Nesta configuração os leitos sólidos são fixos e o movimento contínuo do sólido é simulado pela troca periódica nas portas de entrada e de saída da unidade na mesma direção da corrente da fase móvel, produzindo então a configuração LMS que pode ser visualizada na Figura 3.8. O número de colunas em cada zona permanece o mesmo. Cada seção da unidade LMS é dividida em subseções que imitam o movimento contracorrente da fase sólida. Cada subseção consiste de coluna cromatográfica, equipada com válvulas suficientes para conectá-la a todas as saídas (extrato e refinado) e todas as entradas (alimentação e complementação de solvente) do processo. Após a mistura ou saída de uma corrente externa a corrente resultante é alimentada à coluna cromatográfica seguinte (MAZZOTI;

STORTI; MORBIDELLI, 1997b; MAZZOTI; STORTI; MORBIDELLI, 1997a; JUZA; MAZZOTI; MORBIDELLI, 2000).

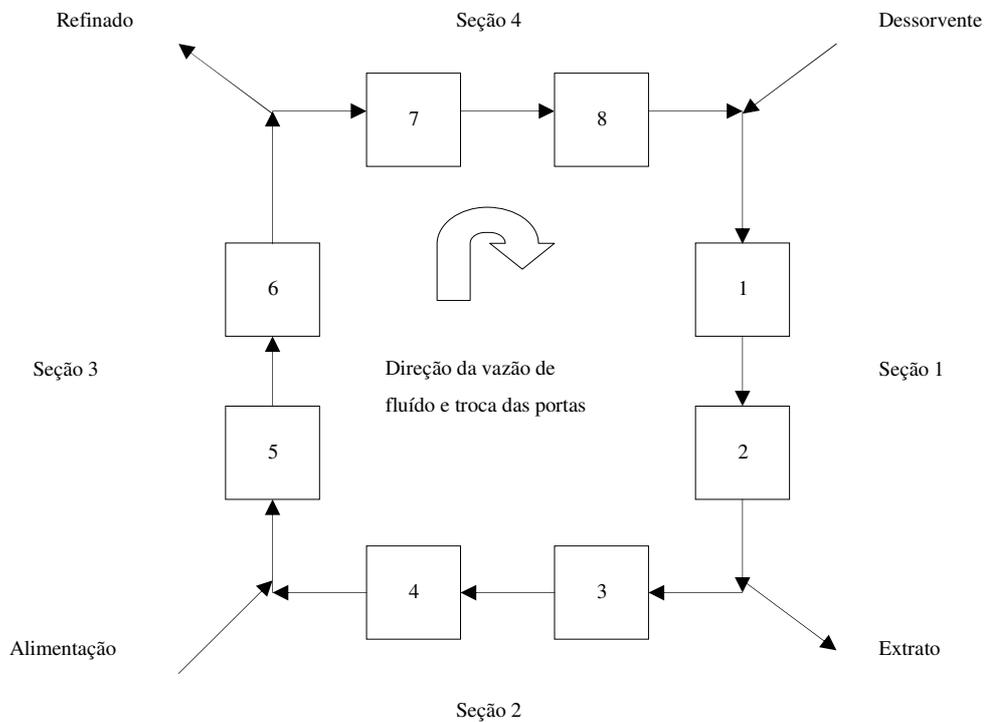


Figura 3.8. Esquema de uma unidade de leito móvel simulado de quatro seções para separações contínuas com distribuição de portas 2-2-2-2.

Para uma melhor exploração do potencial dessas unidades, suas condições de operação devem ser cuidadosamente selecionadas para otimizar a separação, por exemplo, pela minimização do consumo de fase móvel (taxa de vazão de fase móvel complementar) (MAZZOTI; STORTI; MORBIDELLI, 1997b).

Devido a sua natureza contínua de contracorrente, depois das unidades transientes atingirem um estado estacionário, cada variável de processo permanece constante em cada localização da unidade. Ao contrário, o regime estacionário da unidade LMS é um estado estacionário cíclico, no qual a unidade exhibe ao mesmo tempo comportamento dependente

durante cada período de tempo entre duas trocas sucessivas das portas de entrada e saída. Assim, em ordem ao modelar o regime estacionário de uma unidade LMS um modelo de tempo dependente é requerido, enquanto para uma unidade LMV um modelo de tempo independente é suficiente. Desde que as duas configurações são equivalentes, por exemplo, elas atingem as mesmas separações, determinadas regras de conversões geométricas e cinemáticas são realizadas, o modelo simples da unidade equivalente de LMV pode ser usado para prever o estado estacionário de separação das unidades de LMS. As regras de conversões são dadas por (MAZZOTI; STORTI; MORBIDELLI, 1997a):

$$V_j = S b_j V \quad (3.51)$$

$$\frac{V}{t^*} = \frac{Q_s}{1 - \varepsilon} \quad (3.52)$$

$$Q_j^{LMS} = \left[Q_j^{LMV} + \frac{Q_s}{1 - \varepsilon} \right] \quad (3.53)$$

onde V_j e V são os volumes da seção j^{th} da unidade LMV e do leito fixo da unidade LMS, respectivamente; $S b_j$ é o número de subseções na seção j^{th} da unidade LMS, t^* é o tempo de troca da unidade LMS, por exemplo o período de tempo entre duas trocas sucessivas de portas de entrada e saída, ε é a porosidade do leito, Q_s é a vazão volumétrica de sólido na unidade LMV, Q_j^{LMS} e Q_j^{LMV} são as vazões volumétricas na unidade LMS e a equivalente na unidade LMV, respectivamente.

Os parâmetros m_j são chamados de razão de vazão e são definidos como a razão da vazão fluída sobre a vazão da fase sólida em cada seção da unidade.

$$m_j = \frac{Q_j^{LMS} t^* - V \varepsilon_T}{V(1 - \varepsilon_T)} \quad (3.54)$$

A tecnologia de LMS constitui uma unidade de operação complexa, a qual requer um entendimento profundo para fazer o seu uso efetivo. O modelo, baseado na teoria do equilíbrio, na qual a resistência à transferência de massa e a dispersão axial são desprezadas oferece uma visão desse processo. Aplicando esse modelo as unidades LMS sob suposição de isotermas de adsorção do tipo Langmuir produzem a chamada Teoria do Triângulo, a qual permite a determinação de condições de operação do LMS para atingir a separação requerida (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998).

Ao juntar o processo requerido para completa separação com balanço de material nos nós da unidade LMS e usando os resultados da Teoria do Equilíbrio para sistemas do tipo Langmuir o seguinte conjunto de condições, em que as razões de taxa de vazão devem ser cumpridas para atingir a completa separação, é (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998; SUSANTO; WEKENBORG; JUPKE, 2005):

$$m_1 \geq H_A$$

$$H_B < m_2 < m_3 < H_A$$

$$\frac{-\varepsilon_p}{1 - \varepsilon_p} < m_4 < \frac{1}{2} \left[H_B + m_3 + b_B c_{alim,B} (m_3 - m_2) - \sqrt{[H_B + m_3 + b_B c_{alim,B} (m_3 - m_2)]^2 - 4 H_B m_3} \right] \quad (3.55)$$

Assim, define-se uma região de separação no plano (m_2, m_3) , a qual é uma região na forma de um triângulo abw. As fronteiras dessa região podem ser calculadas em termos dos parâmetros de equilíbrio de adsorção (H_A, H_B, b_A, b_B) e da composição de alimentação $(C_{alim,A}$ e $C_{alim,B})$.

Linha wf

$$(H_A - \omega_G (1 + b_A c_{a \text{ lim}, A})) m_2 + b_A c_{a \text{ lim}, A} \omega_G m_3 = \omega_G (H_A - \omega_G) \quad (3.56)$$

Linha wb

$$(H_A - H_B (1 + b_A c_{a \text{ lim}, A})) m_2 + b_A c_{a \text{ lim}, A} H_B m_3 = H_B (H_A - H_B) \quad (3.57)$$

Linha ra

$$m_3 = m_2 + \frac{(\sqrt{H_A} - \sqrt{m_2})^2}{b_A c_{a \text{ lim}, A}} \quad (3.58)$$

Linha ab

$$m_3 = m_2 \quad (3.59)$$

As coordenadas dos pontos de intersecção são dados por:

ponto a (H_A, H_A)

ponto b (H_B, H_B)

ponto f (ω_G, ω_G)

(3.60)

$$\text{ponto r} \left(\frac{\omega_G^2}{H_A}, -\frac{\omega_G [\omega_F (H_A - \omega_G)(H_A - H_B) + H_B \omega_G (H_A - \omega_F)]}{H_A H_B (H_A - \omega_F)} \right)$$

$$\text{ponto w} \left(\frac{H_B \omega_G}{H_A}, \frac{\omega_G [\omega_F (H_A - H_B) + H_B (H_B - \omega_F)]}{H_B (H_A - \omega_F)} \right)$$

Nas equações acima w_F e w_G dependem da composição de alimentação, eles são as raízes da equação seguinte com $w_G > w_F > 0$ (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998).

$$(1 + b_A c_{a\text{lim},A} + b_B c_{a\text{lim},B}) \omega^2 - [H_A (1 + b_B c_{a\text{lim},B}) + H_B (1 + b_A c_{a\text{lim},A})] \omega + H_A H_B = 0$$

(3.61)

Como ilustrado na Figura 3.9 a região de completa separação é cercada por três regiões correspondentes a três regimes de operação diferentes, a região de refinado puro, na qual a corrente de refinado é pura, mas a de extrato é contaminada com componente B, a região de extrato puro, na qual o extrato é puro, mas o refinado não, e a região pura, na qual os componentes A e B se distribuem nas correntes de saída de extrato e refinado, respectivamente, sem contaminação (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998; SUSANTO; WEKENBORG; JUPKE, 2005).

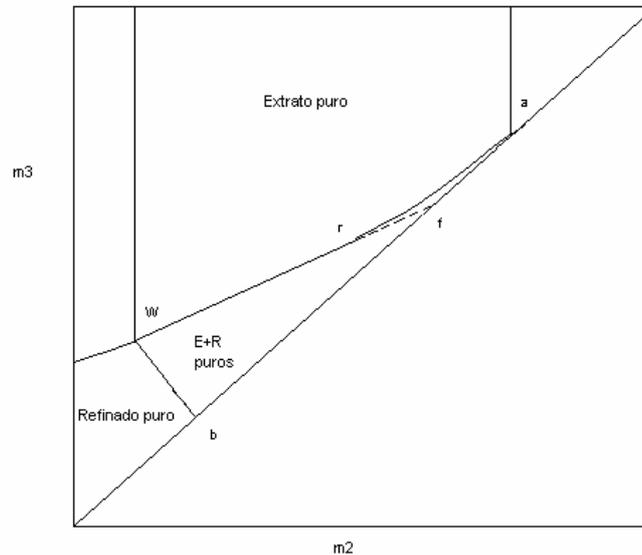


Figura 3.9. Região de um plano (m_2 , m_3) com diferentes regimes de separação em termos de pureza das correntes de saída para um sistema descrito por isothermas de adsorção do tipo Langmuir.

Pode-se notar que o vértice w da região de completa separação no plano (m_2 , m_3) representa a condição de operação ótima em termos de consumo de solvente e produtividade por unidade de massa de fase estacionária. Entretanto, pode-se também observar que uma leve perturbação nas condições de processo, bem como pequenos erros na avaliação dos parâmetros de equilíbrio de adsorção, pode fazer o ponto de operação deixar a localização ótima e mover para fora da região de completa separação. Como consequência, em muitas situações práticas, as vezes é melhor que o ponto de operação seja escolhido dentro do triângulo de separação completa e não no seu vértice (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998).

Quando a mistura alimentada é infinitamente diluída nos componentes a serem separados a isoterma de Langmuir se aproxima de uma isoterma linear e as condições nos parâmetros m_j da unidade LMS reduz ao seguinte conjunto de inequações:

$$H_A < m_1$$

$$H_B < m_2 < H_A$$

$$H_B < m_3 < H_A$$

$$\frac{-\varepsilon_p}{1-\varepsilon_p} < m_4 < H_B$$

(3.62)

Essas são as condições clássicas para separação em LMS sob condições lineares. É de se notar que em casos lineares a região de completa separação é um triângulo quadrado (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998).

Ao aumentar a concentração de alimentação nota-se que o segmento ab permanece o mesmo, a posição do vértice w muda para baixo para esquerda e a região de completa separação se torna mais fina e menos robusta. Em condições robustas, pequenos distúrbios não modificam o comportamento qualitativo da unidade. Isso implica que quando se aumenta a concentração de alimentação a razão de taxa de vazão nas seções 2 e 3, bem como a diferença m_3-m_2 diminui. Através de um balanço material pode-se mostrar que a produtividade máxima é uma função crescente da concentração de alimentação e se aproxima de um valor assintótico. Assim, desde que a produtividade melhora e a robustez se torna mais pobre quando a concentração aumenta, então o melhor valor de concentração de alimentação precisa ser escolhido como um compromisso entre esses dois opostos (MIGLIORINI; MAZZOTI; MORBIDELLI, 1998).

A determinação das vazões em cada corrente do sistema LMS pode ser determinada facilmente por meio de um balanço de massa em cada nó, que pode ser visualizado na Figura 3.8:

$$Q_E = Q_1 - Q_2 \quad (3.63)$$

$$Q_R = Q_3 - Q_4 \quad (3.64)$$

$$Q_F = Q_3 - Q_2 \quad (3.65)$$

onde Q_E é a vazão de extrato, Q_R a vazão de refinado e Q_F a de alimentação.

Já as variáveis desempenho podem ser avaliadas através da produtividade calculada a partir da linha de alimentação e do consumo de dessorvente:

$$\text{Consumo de dessorvente (CD)} = \frac{Q_1 + Q_F}{c_F Q_F} \quad (3.66)$$

$$\text{Produtividade (Pr od)} = \frac{Q_F c_F}{V_{ads}} \quad (3.67)$$

onde c_F é a concentração de alimentação da mistura racêmica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Mitotano

A mistura racêmica do mitotano foi produzida pela empresa Yick-Vic Chemicals and Pharmaceuticals (Hong Kong) e adquirida em quantidade da ordem de 200 gramas. A Figura 3.1 apresenta a estrutura química do mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano). O centro da quiralidade da molécula está situado no átomo de carbono.

4.1.2. Fase estacionária quiral

A coluna cromatográfica recheada com FEQ O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida covalentemente imobilizada à sílica por ligações cruzadas, comercialmente conhecida como Kromasil CHI-TBB foi gentilmente cedida pela Eka Chemicals (Suécia). A coluna com FEQ quiral de aço inoxidável (25 cm x 1 cm D.I., semi-preparativa) foi recheada com a FEQ com tamanho de partículas de 16 µm de diâmetro e com 100 Å (10 nm) de diâmetro de poro. Essa fase é obtida a partir do precursor N,N'-dialil-L-tartardiamida (DATD) pela derivatização de grupos hidroxilas e posterior imobilização em sílica funcionalizada por meio de ligações covalentes. A imobilização em um polímero multifuncional, como é o caso da sílica, fornece a FEQ uma maior eficiência da coluna e uma maior capacidade de saturação, permitindo o uso de elevadas concentrações dos compostos. A Figura 4.1 apresenta a seqüência para produção do polímero quiral.

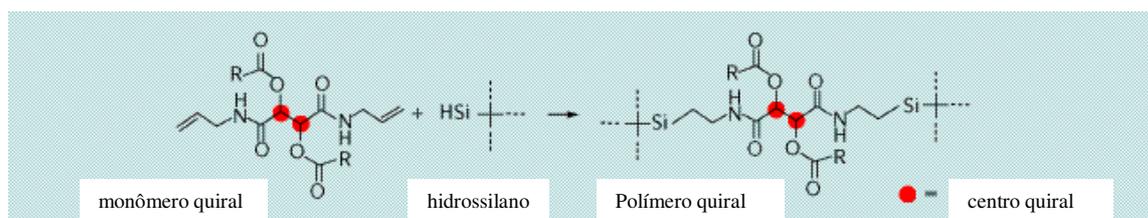


Figura 4.1. Seqüência reacional para produção do polímero quiral a ser ligado à sílica para formar a fase estacionária.

Fonte: Eka Chemicals (2006)

Quando o radical R é O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil], atribui-se a denominação TBB a essa fase estacionária, que é apresentada na Figura 4.2 O radical TBB é incorporado à rede polimérica por uma reação de entrecruzamento, que também causa a ligação covalente com à sílica.

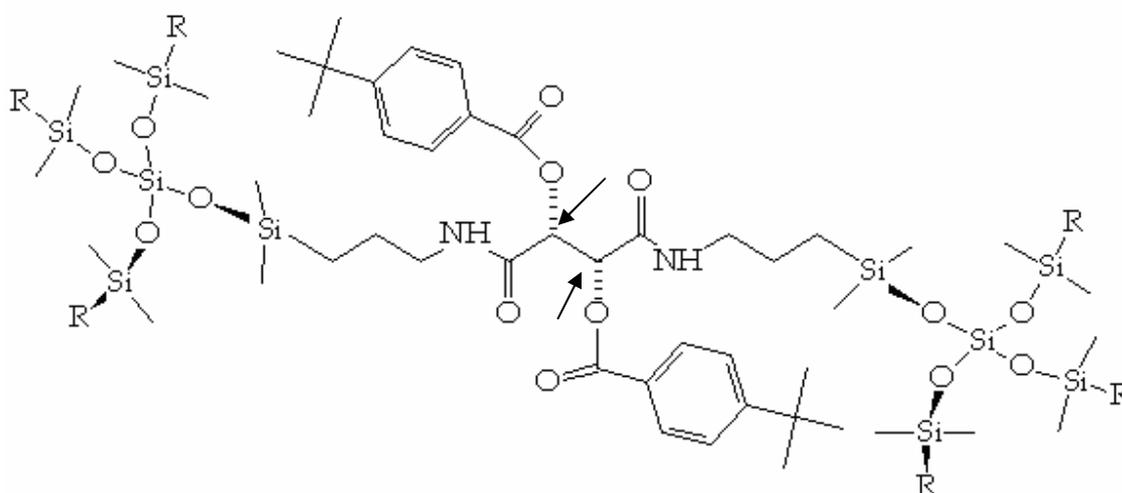


Figura 4.2. Estrutura molecular da FEQ O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. R denota a repetição da unidade do seletor.

Como pode ser visto na Figura 4.2, a rede polimérica resultante incorpora um grupo seletor quiral C_2 -simétrico bifuncional representado pelas setas.

A fase estacionária Kromasil CHI-TBB é capaz de separar uma extensa faixa de fármacos na forma de racematos tanto ácidos, como básicos e neutros. O tamanho reduzido da partícula auxilia em separações difíceis, possibilitando a obtenção de picos cromatográficos melhores resolvidos e simétricos. Ela apresenta boa estabilidade química frente à maioria dos solventes e tampões usados como fase móvel. Entretanto, as melhores condições de seletividade são obtidas com fase normal (solventes apolares). A estabilidade é devida a natureza da rede de polímeros ligado covalentemente à sílica.

A retenção e seletividade nessa FEQ são principalmente causadas por múltiplas ligações de hidrogênio, interações estéricas e interações π - π . Devido às propriedades das ligações de hidrogênio, as separações utilizando esse tipo de FEQ são usualmente realizadas em solventes não polares, dado que um solvente polar irá diminuir as interações entre o analito e o seletor quiral devido a uma solvatação não favorável do analito na fase móvel.

Essa FEQ apresenta maior estabilidade mecânica e relativa baixa queda de pressão quando comparada a outras fases estacionárias. A alta capacidade de carga da fase pode ser atribuída à extensa área de superfície disponível e à alta densidade do ligante quiral.

4.1.3. Composto não retido

A determinação do tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária foi realizada com o composto 1, 3, 5-tri-*tert*-butilbenzeno, conhecido como TTBB, que foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). O TTBB é uma molécula com baixa massa molar (M 264,44 g/gmol) e não interage com a fase estacionária CHI-TBB, sua estrutura molecular é apresentada na Figura 4.3. As moléculas de TTBB penetram nos

poros do leito recheado sem ser adsorvido na sua superfície, sendo que o tempo gasto para percorrer o leito é proporcional a porosidade total.

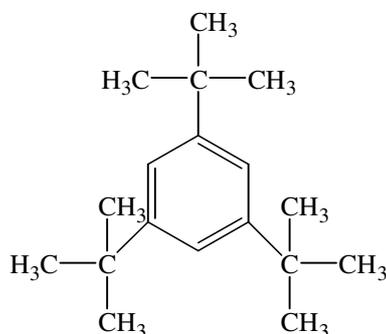


Figura 4.3. Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB).

4.1.4. Fase móvel

O n-hexano e o acetato de etila, grau HPLC, foram adquiridos da Mallinckrodt (EUA), o isopropanol e etanol, grau HPLC, da J.T.Bacher (EUA), o tetrahidrofurano (THF), grau HPLC, da Sigma-Aldrich (EUA). O HFE-7200 3M (TM) Novec (TM) Engineered Fluid (composto de éter nonafluorisobutil etílico e éter nonafluorbutil etílico) foi adquirido da 3M (EUA). As fases móveis preparadas foram desgaseificadas em banho ultra-sônico da Cole Parmer 8892.

4.1.5. Aparelhagem experimental

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um cromatógrafo a líquido com bombas modelo 1525, detector UV-Vis com dois canais de detecção modelo 2487, injetor manual modelo 7725i e forno, todos da Waters (EUA). O sistema de aquisição de dados era computadorizado (software BREEZE). Experimentos de varredura foram

realizados em espectrofotômetro UV-Vis modelo DU640 da Beckman (EUA). A ordem de eluição dos enantiômeros foi verificada em um detector baseado em dicroísmo circular e UV-Vis modelo CD-2095 Plus da Jasco (Japão). Estes dados foram captados por um sistema computadorizado com software da Shimadzu CLASS-VP (Japão).

4.2. Métodos

4.2.1. Experimentos preliminares

4.2.1.1. Definição da fase móvel

Foram realizados estudos com várias combinações de solventes em diferentes proporções com a finalidade de identificar qual dessas combinações resultaria em uma fase móvel mais adequada para posterior análise da separação da mistura enantiomérica. Através de uma pesquisa no catálogo da Kromasil, na qual os compostos enantioméricos com estrutura química semelhante foram separados, foi possível selecionar os seguintes solventes: hexano, etanol, isopropanol, acetato de etila, THF e HFE-7200 3M. Fizeram-se injeções de 20 μL da amostra, a uma concentração total de 0,2 mg/mL. O valor do comprimento de onda (λ) programado no sistema de detecção foi de 270 nm. A fase móvel eluiu a uma vazão de 1,0 mL/min. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.2.1.2. Análise da resposta do sistema de detecção

Para verificar a faixa de comprimento de onda na qual se deveriam conduzir os experimentos fez-se uma varredura em um espectrofotômetro UV-Vis. O equipamento foi calibrado com a solução contendo apenas a fase móvel hexano/acetato de etila (95/5 v/v). Na seqüência, foi realizada uma varredura entre 230 e 300 nm. A amostra contendo o mitotano apresentava uma concentração total de 0,2 mg/mL.

4.2.1.3. Determinação da ordem de eluição

A ordem de eluição dos enantiômeros foi definida por meio da injeção de 200 µL de uma solução de mitotano na forma racêmica em concentração total de 0,2 mg/mL e a uma vazão de 2,0 mL/min de fase móvel composta por 95% hexano e 5% acetato de etila. O sistema de detecção foi ajustado em 270 nm.

4.2.2. Experimentos com soluções diluídas

4.2.2.1. Determinação das porosidades

Inicialmente o volume morto do sistema cromatográfico foi medido por injeção do TTBB (20 µL) na ausência da coluna cromatográfica. Esse volume corresponde a todas tubulações e conexões do sistema cromatográfico, desde o injetor até o detector. Seu valor foi calculado por: $V_D = t_m Q$, onde Q é a vazão volumétrica e t_m o tempo de retenção do

pulso introduzido no sistema, seu valor foi igual a 0,073 mL. Esse volume foi usado para correções nos experimentos posteriores.

Experimentos de pulso cromatográfico com o composto 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) foram realizados com a finalidade de determinar a porosidade total (ϵ_T). O TTBB foi dissolvido na fase móvel, constituída de hexano e acetato de etila (95% e 5%). Uma solução com concentração de 1,0 mg/mL foi preparada e foram feitas injeções de 20 μ L desta solução, após um período de estabilização do sistema a diferentes vazões da fase móvel (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mL/min) e temperatura de 25 °C. As respostas dos pulsos cromatográficos com TTBB foram monitoradas pelo detector UV-Vis no comprimento de onda 270 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

O valor da porosidade total foi obtida através do primeiro momento, equação 3.17. Como o TTBB é um composto inerte o termo relativo a adsorção é desprezado. A inclinação do gráfico do primeiro momento em função de L/u será o valor de ϵ_T .

O valor da porosidade do leito foi calculado por Sartor (2006), foi determinado através de injeções de 20 μ L do composto poliestireno (Poymer Laboratorie, Reino Unido) em concentração 0,5 mg/mL dissolvido em THF, utilizando como fase móvel THF, conforme procedimento sugerido pelo fabricante da coluna. Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 4.4. Por não sofrer interações com a fase estacionária e devido a sua elevada massa molar (M 504500 g/gmol), ele é capaz de se difundir pela coluna cromatográfica passando apenas nas regiões entre as partículas, não adentrando nos poros. O tempo de retenção do poliestireno na temperatura de 25 °C nas vazões 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mL/min permitiram a construção da curva do primeiro momento por L/u cuja inclinação fornece diretamente o valor da porosidade do leito ϵ .

O valor da porosidade da partícula foi obtido pela equação 3.11.

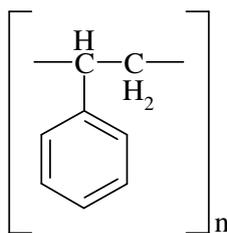


Figura 4.4. Estrutura molecular do composto poliestireno.

4.2.2.2. Determinação dos parâmetros cromatográficos

O estudo de separação com mitotano foi realizado com injeções da solução de mitotano racêmico a 0,2 mg/mL na fase móvel. Volumes de 20 μ L foram injetados no sistema cromatográfico à vazão de fase móvel 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL/min. As temperaturas avaliadas foram de 25 °C, 35 °C, 45 °C e 55 °C. As respostas das injeções foram monitoradas no detector UV-Vis a 270 nm. Parâmetros cromatográficos como fator de retenção, fator de separação, resolução, fator de assimetria e número de pratos foram determinados. Experimentos nas mesmas condições foram realizados utilizando TTBB. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.2.2.3. Determinação das constantes de equilíbrio e constantes de Henry

As constante de equilíbrio foram determinadas a partir dos tempos de retenção ($t_{R,i}$) obtidos com as injeções de 20 μ L, no sistema cromatográfico, das soluções dos enantiômeros do mitotano a 0,2 mg/ mL, realizadas para a determinação dos parâmetros cromatográficos de separação. Por se tratar de solução diluída, de acordo com o método dos momentos, μ_1 corresponde ao tempo de retenção de cada enantiômero. A inclinação da reta

do gráfico do primeiro momento por L/u permite o cálculo indiretamente do valor de K para os enantiômeros.

As constantes de Henry (H) podem ser determinadas de duas maneiras. Uma forma é através do valor calculado de K e a equação 3.21. Outra forma é a partir dos tempos de retenção ($t_{R,i}$) dos enantiômeros e do composto não retido (t_M) TTBB determinados pelos experimentos de pulsos e calculado pela equação 3.22.

4.2.2.4. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa

Os experimentos realizados para determinação dos cálculos dos parâmetros cromatográficos de separação foram utilizados para calcular os coeficientes de dispersão axial (D_L) e o parâmetro de transferência de massa global (k_m). Os valores de altura equivalente a um prato (H) foram calculados pela equação 3.3. Os valores de D_L e k_m foram calculados através do segundo momento (equação 3.20). Construíram-se gráficos de H em função de u e realizou-se, para os dados obtidos, um ajuste tendo como base à equação 3.25. A partir desse ajuste foram determinados os valores de A , B e C , sendo então calculados os valores de D_L e k_m .

4.2.2.5. Análise termodinâmica

Os dados obtidos nos experimentos realizados para determinação dos parâmetros cromatográficos foram utilizados para análise termodinâmica de adsorção. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados pelas equações 3.31, 3.33 e 3.34.

4.2.3. Experimentos com soluções concentradas

4.2.3.1. Determinação das isotermas de adsorção

A obtenção de isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano baseou-se na determinação da curva de ruptura para a mistura racêmica nas concentrações 1,00; 4,00; 7,00; 10,00; 13,00 e 16,00 g/L. A princípio, a coluna foi equilibrada com fase móvel sendo alimentada por uma das bombas do sistema cromatográfico, sob vazão de 1,00 mL/min, até a estabilização do sistema. Neste momento programou-se uma repentina troca na alimentação do sistema, de forma que, a segunda bomba substituísse a alimentação da fase móvel pela solução de mitotano. Um volume contínuo foi alimentado até a saturação da coluna (15 mL), situação na qual a concentração na saída foi a mesma da alimentação. Houve então mudança para bomba inicial de alimentação da fase móvel e assim manteve-se o experimento até a completa remoção do mitotano da coluna. Este procedimento foi seguido para diferentes concentrações e a análise da resposta do sistema de detecção possibilitou o cálculo dos pontos da isoterma. Curvas analíticas possibilitaram a determinação das concentrações a partir da resposta do detector. Os experimentos foram realizados a 280 nm. A mudança do comprimento de onda de 270 nm para 280 nm foi necessária devido ao estouro de escala do valor de absorbância (AU) para as altas concentrações. Os dados de equilíbrio foram calculados a partir dos volumes de retenção dos platôs observados nas frentes de adsorção para cada curva de ruptura conforme equação 3.46.

4.2.3.2. Estudo de sobrecarga na coluna

O estudo de sobrecarga da coluna foi realizado para verificar o comportamento de eluição e alargamento dos picos cromatográficos de cada enantiômero. Os experimentos

foram realizados variando-se a concentração total de alimentação da mistura. (10, 50 e 100 g/L) a um volume de injeção constante igual a 20 μ L e vazão de 1,00 mL/min. As respostas foram monitoradas pelo sistema UV-Vis no comprimento de onda de 270 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Definição da fase móvel

A coluna Kromasil CHI-TBB foi escolhida pois tem separado inúmeros compostos com estrutura química semelhante. Ela já foi utilizada por outros alunos do Laboratório de Separações da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp para separação de outros fármacos, como no trabalho de mestrado de Sartor (2006) e de doutorado de Silva Jr. (2006). Estando definida a FEQ, foram, então, realizados experimentos para definir a fase móvel. Nos primeiros experimentos utilizou-se como principal componente da fase móvel o hexano com a adição de modificadores como THF, etanol, isopropanol e acetato de etila. A Figura 5.1 apresenta um cromatograma na qual a fase móvel foi composta exclusivamente por hexano. Nota-se avaliando a resolução (R_s) e o fator de separação (α) que esta foi satisfatória, com R_s igual a 1,76 e α igual a 1,11.

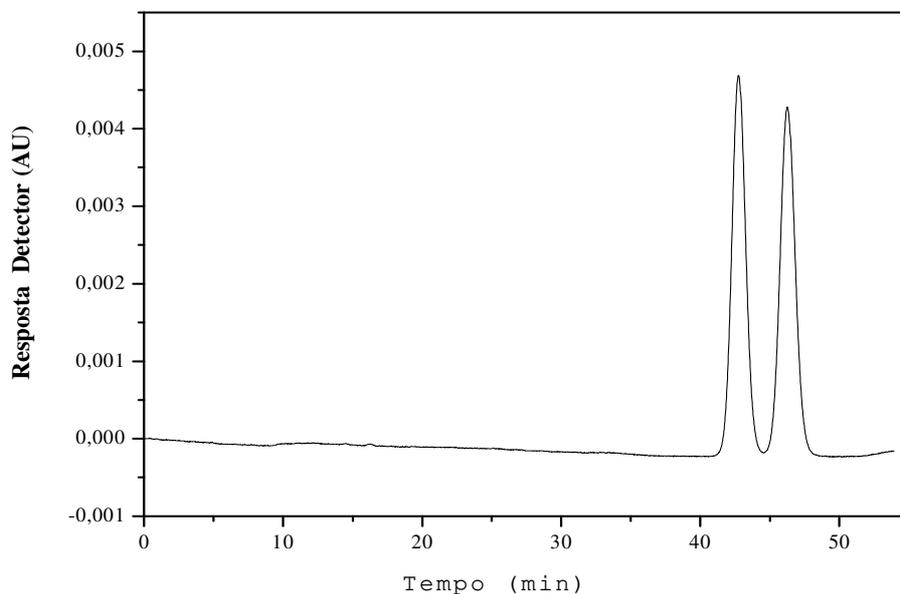


Figura 5.1. Cromatograma de separação dos enantiômeros do mitotano. Fase móvel 100 % hexano, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Com o objetivo de otimizar a separação levando-se em conta o tempo necessário para isso, foram acrescentados modificadores a diferentes proporções. De acordo com Francotte (2001) a redução no tempo de retenção, em condições de fases normais (fase estacionária mais polar que a fase móvel), é geralmente atingida pelo aumento no volume de modificadores polares, entretanto não é possível prever como essas mudanças afetam a resolução e o fator de separação. A Figura 5.2 apresenta os valores da resolução (R_s) e os valores dos fatores de retenção (k_i) utilizando THF a várias proporções para ambos os enantiômeros (onde 1 é o enantiômero menos retido e 2 o mais retido).

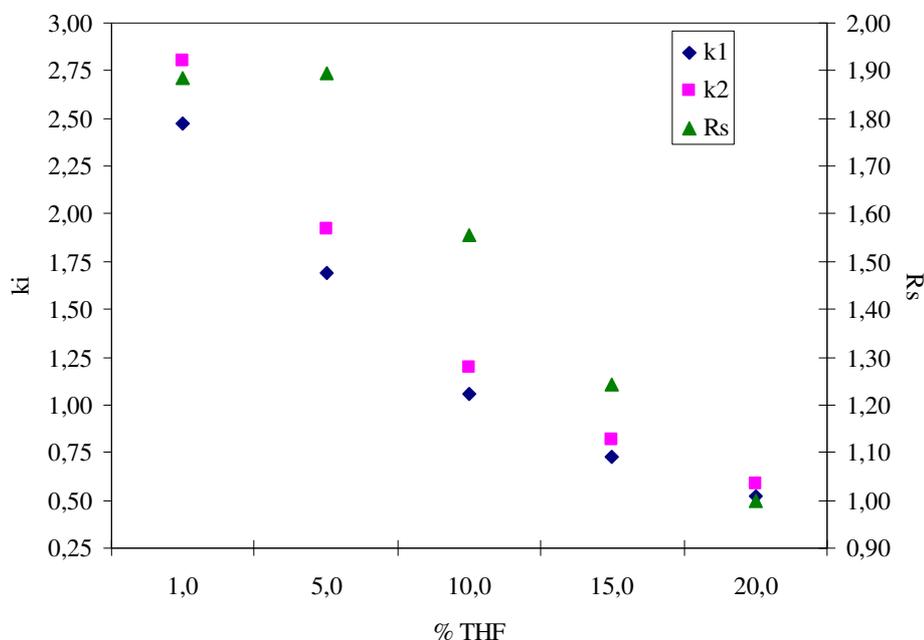


Figura 5.2. k_i e R_s em função da % de THF, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Com a mesma intenção de reduzir a variável tempo, foram realizados experimentos com a adição de álcoois à fase móvel. As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam os valores de R_s e k_i para ambos os enantiômeros, utilizando etanol e isopropanol, respectivamente.

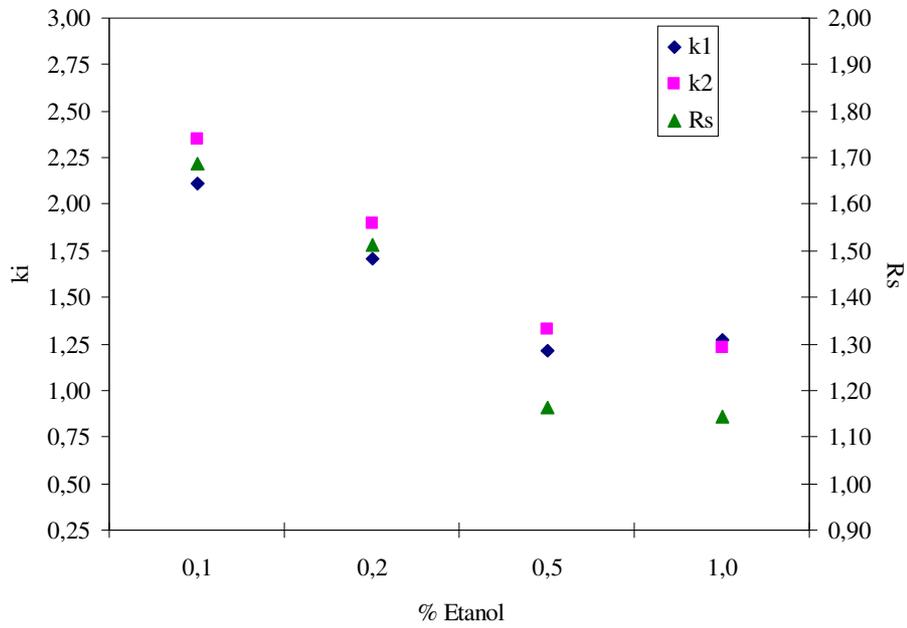


Figura 5.3. k_i e R_s em função da % de etanol, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.

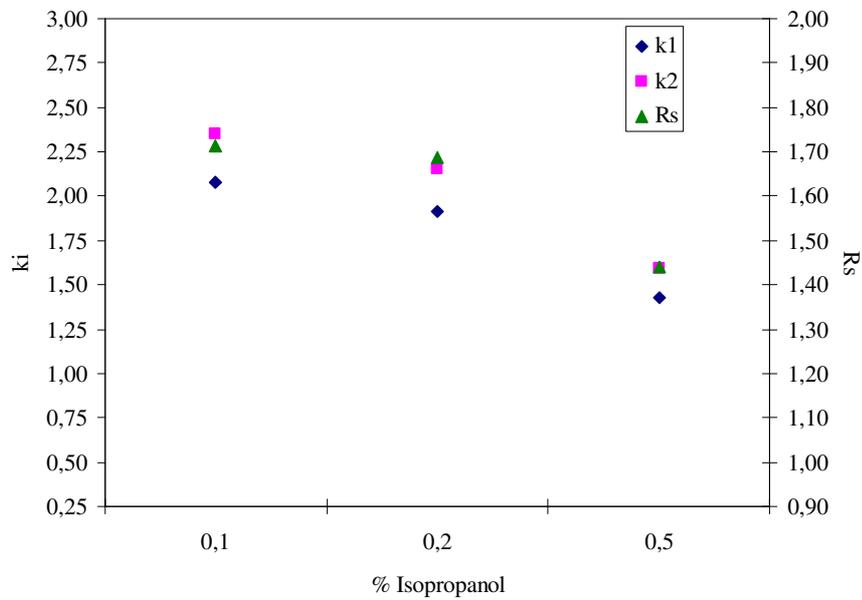


Figura 5.4. k_i e R_s em função da % de isopropanol, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Por fim, foi adicionado também acetato de etila com a finalidade de otimização da fase móvel. A Figura 5.5 apresenta os valores de R_s e k_i .

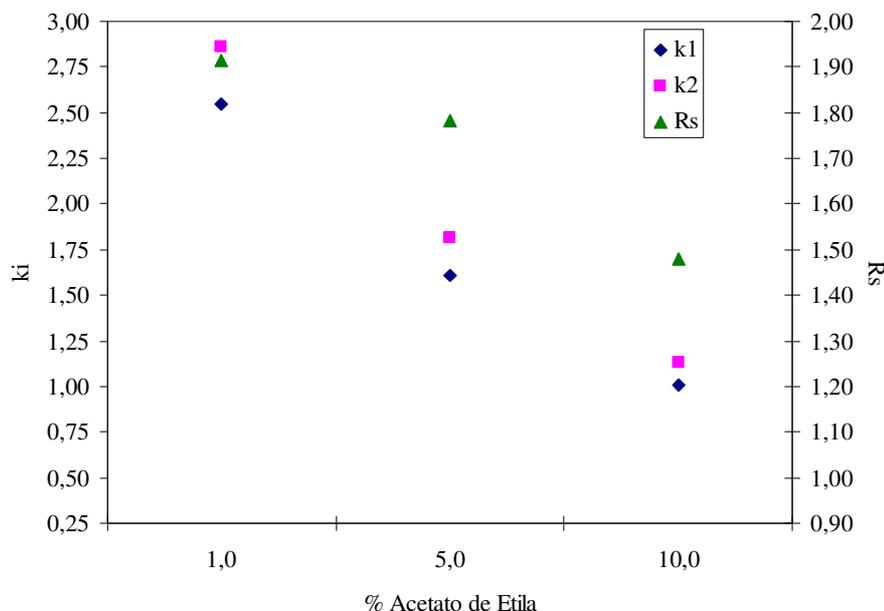


Figura 5.5. k_i e R_s em função da % de acetato etila, vazão 1 mL/min e $\lambda = 270$ nm.

A Tabela 5.1 apresenta os valores dos fatores de separação (α) para os experimentos realizados.

Como pôde ser observado para todos os casos os valores de k_i diminuem com o aumento do modificador, o aumento da polaridade da fase móvel e assim uma maior competição pelos sítios de adsorção levaram a essa diminuição. Os valores de resolução também diminuíram, exceto para o caso da adição de 5 % de THF onde houve um ligeiro aumento se comparado a 1%. Os valores de α não sofreram variações tão elevadas ao se comparar o mesmo modificador e o aumento da sua quantidade. Comparando-se os resultados obtidos utilizando o etanol e o isopropanol nas mesmas proporções, melhores valores de resolução e fator de separação foram obtidos com o uso do isopropanol, porém os tempos de retenção dos enantiômeros foram maiores. Isso ocorre pois o etanol possui um parâmetro de polaridade maior que o isopropanol, como será discutido posteriormente.

Tabela 5.1. Valores de α calculados para os experimentos realizados com o objetivo de otimização da fase móvel.

%	α			
	THF	Etanol	Isopropanol	Acetato Etila
0,1	-	1,114	1,131	-
0,2	-	1,109	1,122	-
0,5	-	1,093	1,114	-
1	1,132	1,030	-	1,123
5	1,137	-	-	1,130
10	1,132	-	-	1,127
15	1,126	-	-	-
20	1,124	-	-	-

Para verificar como a quantidade e o tipo de modificador influenciam nos valores de k_i foi ajustado um modelo de acordo com Wewers; Dingene; Kinkel, 2005:

$$k_i = k_{oi} \exp(-S \theta) \quad (5.1)$$

onde k_{oi} representa o fator de retenção do solvente puro, θ a fração do modificador e S o fator força peso do solvente (força de eluição).

A força cromatográfica do solvente é atribuída em função da polaridade da fase móvel. Dessa forma, o solvente denomina-se forte quando possui grau de polaridade semelhante ao da fase estacionária, caso contrário, denomina-se fraco. A retenção de um componente é controlada pela força do solvente. Em cromatografia líquida de fase normal, na qual a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, solventes polares são denominados fortes e os mais apolares são fracos. (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006)

A Figura 5.6 mostra o ajuste das variações dos fatores de retenção com a quantidade de modificador de acordo com a equação 5.1 para os dados de k obtidos experimentalmente, para os modificadores THF, etanol, isopropanol e acetato de etila.

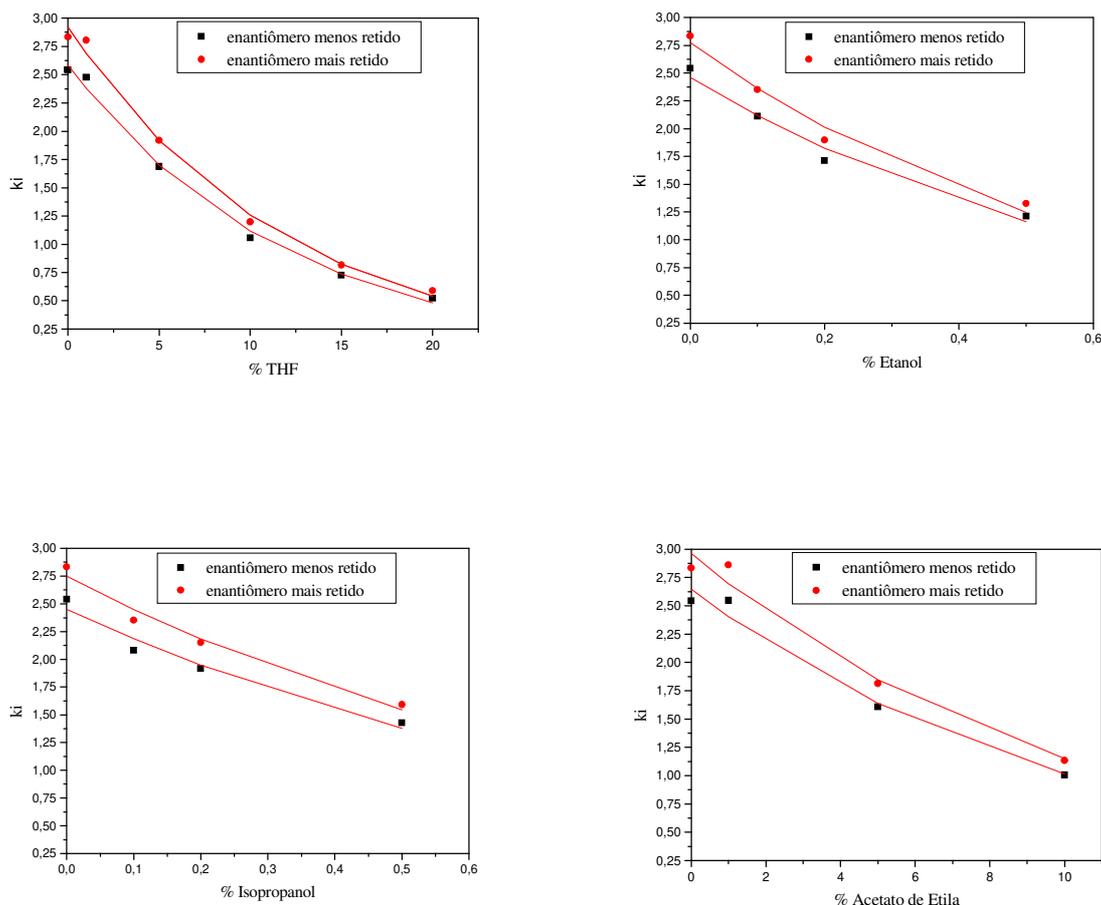


Figura 5.6. Variação do fator de retenção dos enantiômeros com a quantidade de modificador.

A Tabela 5.2 apresenta os valores de k_0 e S obtidos pelo ajuste, juntamente com seus erros, para os modificadores THF, etanol, isopropanol e acetato de etila para ambos os enantiômeros, onde 1 é o enantiômero menos retido e 2 o mais retido. Essa tabela também apresenta os parâmetros de polaridade (ϵ°) para os modificadores puros segundo Snyder

para cromatografia por adsorção (Fonte dos valores de ϵ° : JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Tabela 5.2. Valores de k_o e S para ambos os enantiômeros para os modificadores estudados.

	k_{o1}	k_{o2}	S_1	S_2	ϵ°
THF	$2,59 \pm 0,08$	$2,92 \pm 0,05$	$0,084 \pm 0,004$	$0,084 \pm 0,004$	0,57
Etanol	$2,46 \pm 0,12$	$2,77 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,22$	$1,60 \pm 0,16$	0,88
Isopropanol	$2,45 \pm 0,08$	$2,75 \pm 0,08$	$1,15 \pm 0,17$	$1,15 \pm 0,15$	0,82
Acetato de Etila	$2,65 \pm 0,11$	$2,96 \pm 0,11$	$0,096 \pm 0,012$	$0,095 \pm 0,011$	0,58

A partir da Tabela 5.2 pôde-se observar que os valores de k_o para o enantiômero menos retido ficaram próximos de 2,54 e para o mais retido de 2,85, esse parâmetro indica o fator de retenção utilizando hexano puro. Já os valores de S para um mesmo modificador ficaram próximos para ambos os enantiômeros, o que era esperado visto que a força peso do solvente é uma propriedade do modificador orgânico. O maior valor de S obtido foi ao se utilizar como modificador o etanol, o que já era esperado visto que esse solvente apresenta um maior parâmetro de polaridade, enquanto que o menor valor obtido foi ao se utilizar THF, que apresenta um ϵ° menor.

Através das expressões de k obtidas pelo ajuste foi possível calcular os valores de α e comparar com os valores desse parâmetro obtidos experimentalmente. A Figura 5.7 apresenta os valores de α calculados pelo modelo e os obtidos experimentalmente. Pode-se verificar que os valores de α não possuem uma variação muito elevada para um mesmo modificador e a variação de sua quantidade, como já observado na Tabela 5.1. Os valores calculados ficaram próximos dos obtidos experimentalmente.

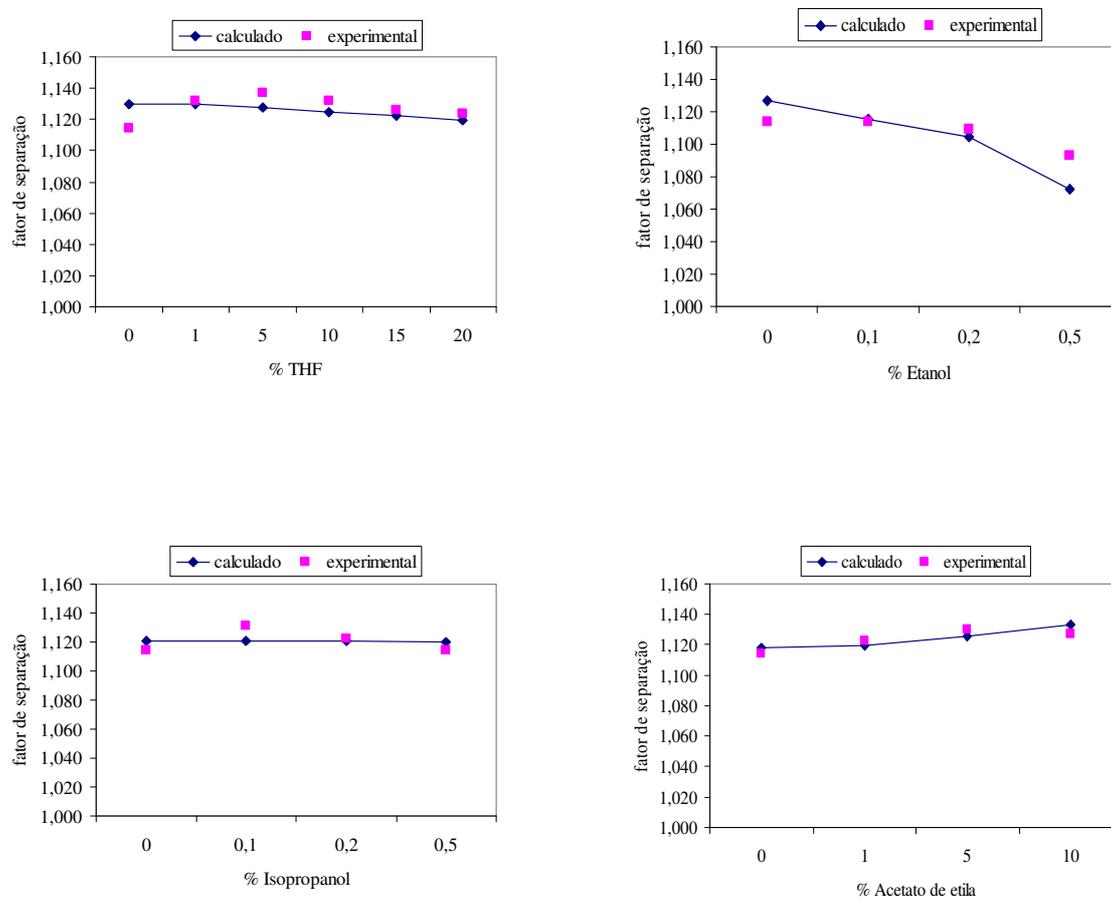


Figura 5.7. Variação do fator de separação calculados e obtidos experimentalmente com a quantidade de modificador.

Em seguida foram realizados experimentos utilizando o HFE-720 3M e a adição de modificadores. Esse solvente foi escolhido, pois segundo Kagan (2001) ele é uma alternativa a utilização do hexano em cromatografia líquida em fase normal, sendo um fluído que não atinge a camada de ozônio. É não inflamável, não irritante, não tóxico e não tem propriedades mutagênicas, além de ser de fácil recuperação em escala laboratorial. O valor comercial desse solvente, porém, é bem mais elevado se comparado ao solvente hexano. Kagan (2001) utilizou como fase móvel HFE-720 3M e metanol na separação de esteróides, benzodiazepinas, misturas de purinas e pirimidinas, entre outros compostos em

colunas Chiracel. Ele obteve uma melhora do fator de separação (seletividade) para alguns casos ao utilizar esse solvente ao invés de hexano. Os valores de R_s , k_i e α obtidos em alguns dos experimentos realizados com esse solvente adicionando diferentes proporções de THF, etanol e a acetato de etila estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Valores de R_s , k_i e α obtidos para os alguns dos experimentos realizados com HFE-720 3M e modificadores.

	R_s	k_1	k_2	α
5% THF	1,544	6,814	7,474	1,097
20% THF	1,036	2,159	2,321	1,075
5% Etanol	-	3,891	4,065	1,045
10 % Acetato Etila	1,477	4,451	4,883	1,097

Como pôde ser observado na Tabela 5.3 os valores de k_i , utilizando 5% de THF, 5% de etanol e 10% de acetato de etila, são bem mais elevados se comparados aos experimentos realizados utilizando hexano como solvente, indicando que para alguns casos provavelmente a fase móvel possui uma polaridade resultante menor. Pode-se notar também que os valores de resolução não foram melhores, apesar dos valores de k_i não serem tão elevados ao utilizar 20% de THF a resolução obtida foi baixa. Os valores de α também foram mais baixos.

Avaliando R_s , k_i e α obtidos experimentalmente, verificou-se que os melhores valores desses parâmetros foram obtidos ao se utilizar como fase móvel 95% de hexano e 5% de THF e 95% de hexano e 5 % de acetato de etila. Como o valor comercial do acetato de etila é menor do que do THF escolheu-se como fase móvel (FM) uma solução de 95 % de hexano e 5% de acetato de etila para a realização de todos os experimentos.

5.2. Avaliação da resposta do sistema de detecção

Realizou-se uma varredura em espectrofotômetro UV-Vis com a mistura enantiomérica do mitotano em concentração total de 0,2 mg/mL. Os resultados de absorvância para a mistura foram realizados na faixa de comprimento de onda de 230 a 300 nm. A curva de absorvância em função de λ apresentou vários pontos de máximo, sendo dois deles valores próximos a 270 nm. Foi escolhido, então, o comprimento de onda de 270 nm para todos os experimentos.

5.3. Ordem de eluição

A definição da ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada utilizando-se um sistema de detecção baseado em dicroísmo circular (DC) e UV-Vis. Na aplicação do dicroísmo circular para análise de misturas enantioméricas, os sinais obtidos são proporcionais à diferença de concentração entre os dois enantiômeros (BLANCO *et al.*, 2001). Na ocasião de separação, cada enantiômero dará uma resposta característica, sendo esta positiva ou negativa, dependendo do tipo de detector usado.

A Figura 5.8 mostra o perfil de eluição dos enantiômeros, onde o sinal do DC (dicroísmo circular) e UV estão em mV. Nota-se que o enantiômero menos retido proporciona rotação negativa do plano da luz. Desta forma, percebe-se que o primeiro componente a sair da coluna trata-se do S (-)-mitotano. Por consequência, o mais retido apresenta rotação positiva para o plano da luz e refere-se ao R (+)-mitotano.

É importante ressaltar que para proceder esse experimento foi realizado uma adaptação no sistema cromatográfico. Por esta razão, o volume morto do sistema resultante é bem maior que o apresentado no sistema cromatográfico utilizado nos demais experimentos. Isto explica os maiores tempos de retenção para os componentes.

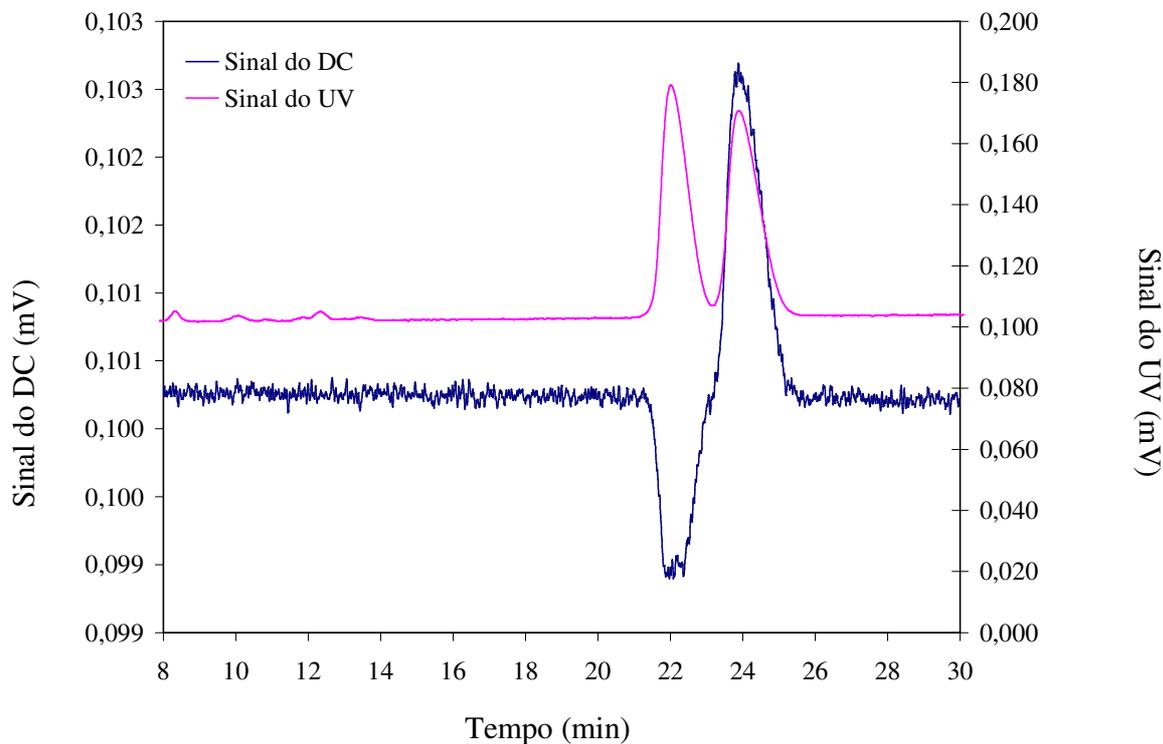


Figura 5.8. Cromatograma mostrando a ordem de eluição dos enantiômeros do mitotano.

$V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, $Q = 2,0 \text{ mL/min}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$.

5.4. Parâmetros de separação cromatográfica

As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam os cromatogramas do composto inerte TTBB e dos enantiômeros do mitotano, respectivamente. Nota-se na Figura 5.9 que o tempo de retenção e largura da base do pico de eluição são relativamente pequenos. Este resultado é esperado, visto que se trata de um composto que não sofre interações estereosseletivas com a FEQ. Na Figura 5.10, as larguras das bases dos picos de eluição dos enantiômeros são maiores que a do TTBB, demonstrando as diferenças no processo de eluição entre o composto inerte e os que sofrem interações com a fase estacionária. As diferentes interações estéricas existentes entre os enantiômeros do mitotano e a FEQ resultam em mecanismo de retenção que promovem a sua separação. Porém, as larguras das bases para os enantiômeros são relativamente pequenas, indicando que a eficiência da coluna é alta e

que a transferência de massa deve ser rápida. Com o objetivo de averiguar como estas interações se comportam em condições experimentais adversas, foram analisados os parâmetros de separação em diferentes vazões da fase móvel e temperaturas.

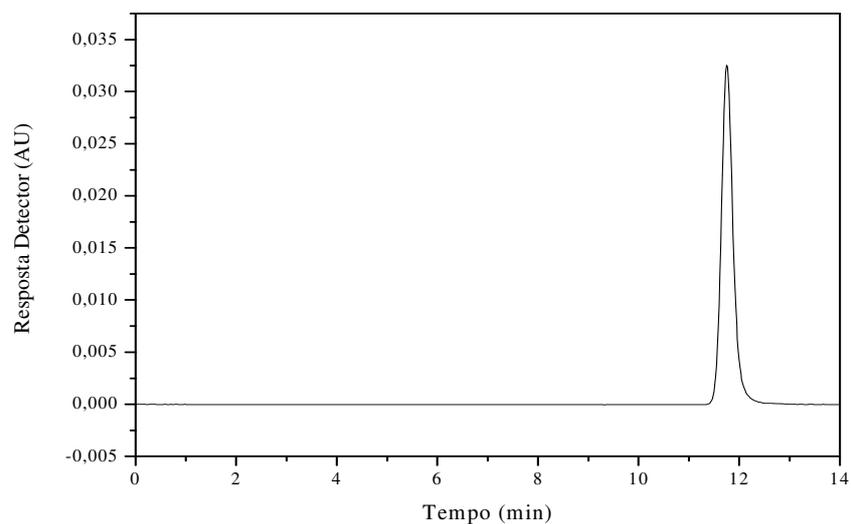


Figura 5.9. Cromatograma do composto inerte TTBB. $c_{\text{TTBB}} = 1,0 \text{ mg/mL}$ e $Q = 1 \text{ mL/min}$.

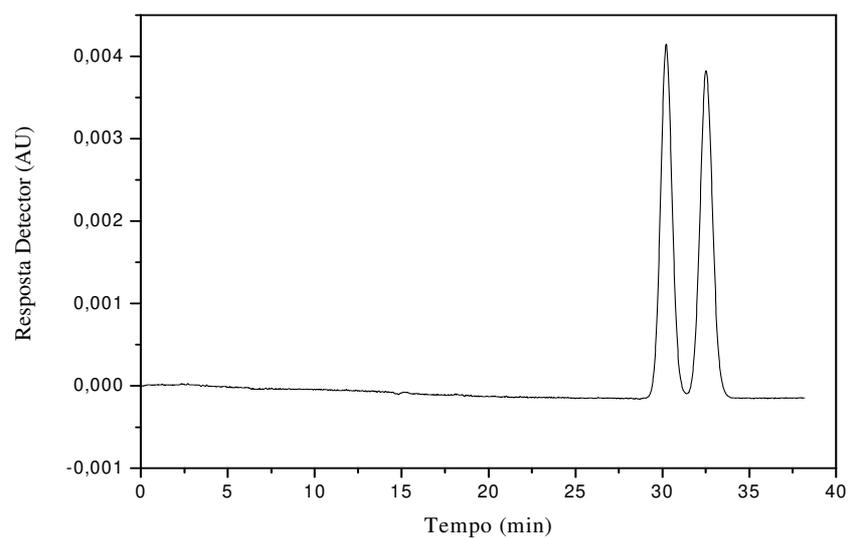


Figura 5.10. Cromatograma da separação dos enantiômeros do mitotano. $c_{\text{mistura}} = 0,2 \text{ mg/mL}$ e $Q = 1 \text{ mL/min}$.

A Tabela 5.4 apresenta os parâmetros cromatográficos de cada composto em diferentes vazões a 25 °C. Os fatores de retenção (k_i) apresentam valores médios de 1,623 e 1,832 para os enantiômeros S(-) e R(+), respectivamente. Os fatores de assimetria (A_s) apresentaram-se próximos à unidade, mostrando comportamento próximo ao Gaussiano. O valor de α mostrou-se próximo de 1,129.

Tabela 5.4. Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do mitotano em diferentes vazões de fase móvel a 25 °C.

Q (mL/min)	k_s	k_R	A_{sS}	A_{sR}	α
1,0	1,603	1,805	1,035	1,055	1,126
2,0	1,622	1,829	0,993	1,022	1,128
3,0	1,654	1,870	-	-	1,131
4,0	1,614	1,823	-	-	1,129

Outra variável importante a ser determinada para se avaliar a separação é a resolução (R_s), que engloba parâmetros de eficiência, retenção e seletividade. A resolução foi avaliada nas diferentes vazões e temperaturas como pode ser visto na Figura 5.11. Para as condições analisadas houve diminuição da resolução provocada tanto pelo aumento da vazão quanto pelo aumento da temperatura. Para uma mesma temperatura os valores k e α permanecem praticamente constantes ao aumentar-se a vazão, já o número de pratos tende a diminuir, ocasionando assim uma diminuição na resolução. Dentro das condições experimentais estudadas, valor ótimo de resolução foi obtido em 1,0 mL/min e 25 °C.

A Figura 5.12 mostra como o aumento da temperatura pode diminuir os tempos de retenção dos enantiômeros nas diferentes vazões, isso ocorre provavelmente porque há uma redução da viscosidade da fase móvel aumentando a velocidade de interação do composto com a FEQ. A aproximação dos picos com o aumento da temperatura (diminuição dos fatores de separação) e a redução nos tempos de retenção acarretaram em uma diminuição da resolução, pode-se observar também um menor alargamento dos picos com o aumento da temperatura, indicando maiores valores de número de pratos.

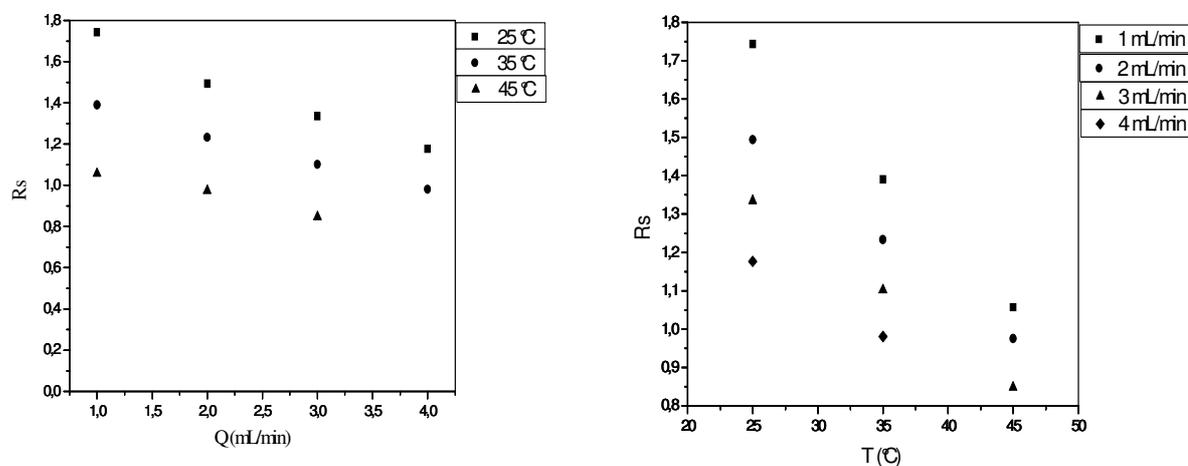


Figura 5.11. Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão e temperatura.

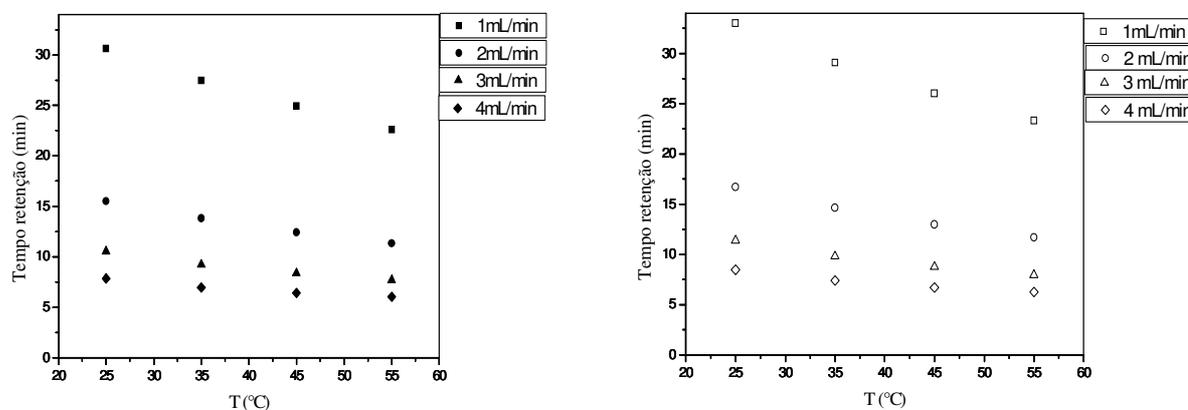


Figura 5.12. Variação do tempo de retenção dos enantiômeros com a temperatura para diferentes vazões. Símbolos preenchidos para o S(-) e vazados para o R(+)

A Tabela 5.5 apresenta a influência da temperatura sobre os parâmetros cromatográficos, mantendo-se a vazão de fase móvel constante em 1,0 mL/min.

Tabela 5.5. Efeito da temperatura nos parâmetros de separação, $Q = 1\text{mL/min}$.

T (°C)	k_s	k_R	α
25	1,603	1,805	1,126
35	1,284	1,421	1,107
45	1,131	1,225	1,083
55	0,955	1,019	1,067

Os experimentos realizados na temperatura de 25 °C proporcionaram, para os dois enantiômeros, maiores valores de k_i que diminuiram com a elevação da temperatura. Comportamento semelhante pôde ser notado para α .

5.5. Determinação das porosidades, constantes de equilíbrio e constantes de Henry

A porosidade total da coluna (ε_T) a 25 °C foi determinada pela equação 3.17 de acordo com a metodologia proposta. O valor alcançado para a temperatura de 25 °C foi de 0,598, com coeficiente de correlação de 1. A Figura 5.13 apresenta o gráfico do primeiro momento, que é igual ao tempo de retenção do TTBB, em função de L/u . A inclinação da reta forneceu o valor da porosidade total.

Tendo-se a porosidade total e a porosidade do leito ($\varepsilon = 0,380$), pode-se determinar a porosidade da partícula de acordo com a equação 3.11. Obteve-se ε_p igual a 0,352. Este valor corresponde à fração de vazios das partículas que compõe a fase estacionária que recheia a coluna cromatográfica.

Os valores das constantes de equilíbrio dos enantiômeros do mitotano foram determinadas através da construção do gráfico do primeiro momento em função de L/u e a equação 3.17, onde $u_0 = u/\varepsilon$. Esses gráficos estão apresentados nas Figuras 5.14, 5.15, 5.16 e 5.17, para as temperaturas de 25 °C, 35 °C, 45 °C e 55 °C, respectivamente.

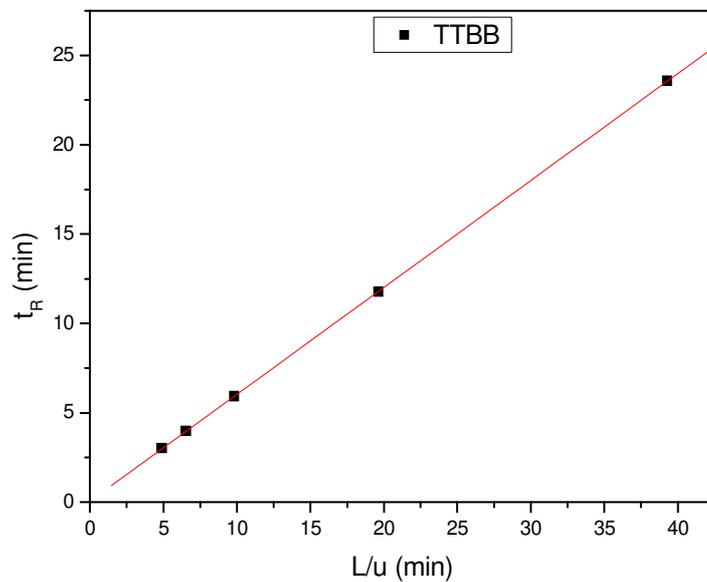


Figura 5.13. Primeiro momento para o composto inerte TTBB a 25 °C.

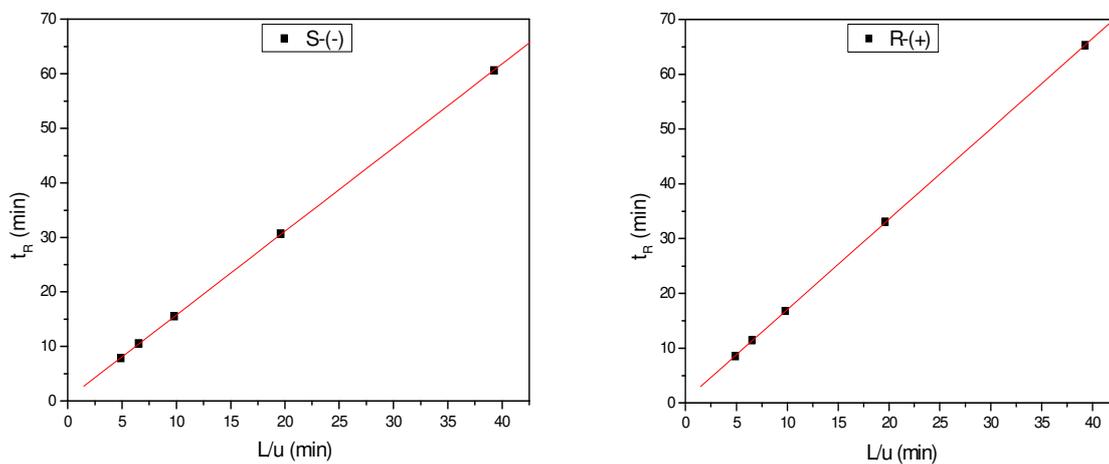


Figura 5.14. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a 25 °C.

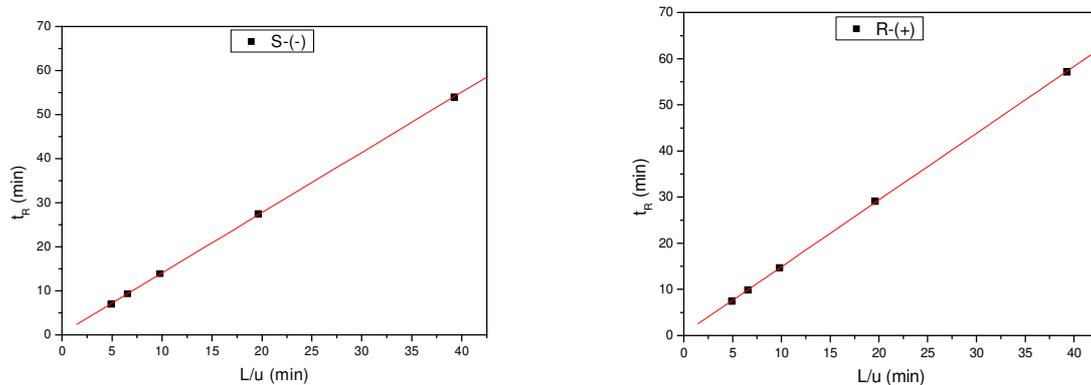


Figura 5.15. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a 35 °C.

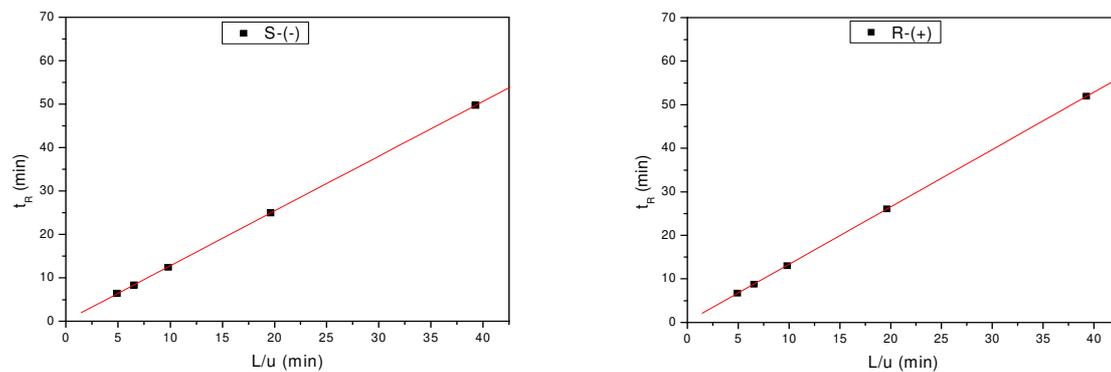


Figura 5.16. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a 45 °C.

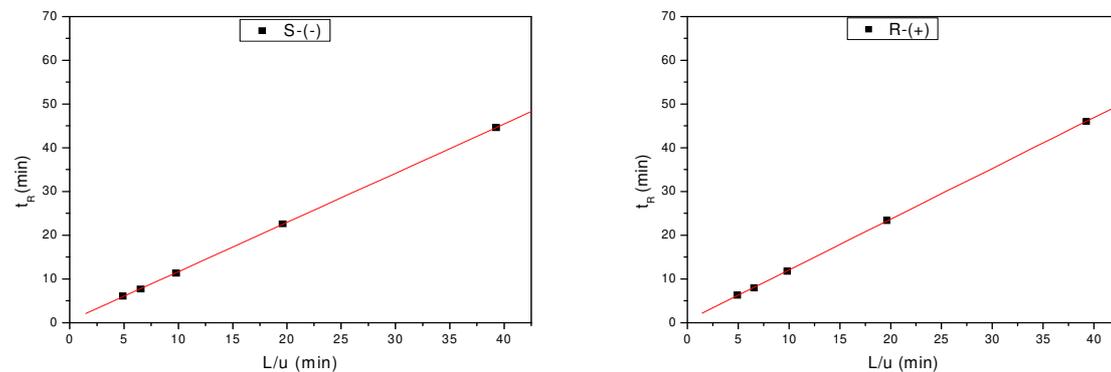


Figura 5.17. Primeiro momento para os enantiômeros do mitotano a 55 °C.

A Tabela 5.6 apresenta os valores de K nas temperaturas estudadas. Nota-se que os coeficientes de correlação se mostraram muito próximos à unidade, indicando que os pontos experimentais foram bem ajustados a uma reta. Como esperado, o enantiômero R-(+) apresenta maiores valores de K, comprovando sua maior interação com o material adsorvente. Esses valores diminuíram com o aumento da temperatura.

A temperatura influencia diretamente nas propriedades físicas tanto do material adsorvente quanto dos solventes que compõem a fase móvel. Como a retenção de um componente é governada por interações variadas entre o soluto, o adsorvente e a fase fluida, a elevação da temperatura acaba refletindo na intensidade de interação dos enantiômeros.

Tabela 5.6. Valores de K para os enantiômeros do mitotano a diferentes temperaturas.

T (°C)	K _S	R ²	K _R	R ²
25	1,86	0,999	2,05	0,999
35	1,59	0,999	1,72	0,999
45	1,42	0,999	1,51	0,999
55	1,20	0,999	1,26	0,999

A Tabela 5.7 apresenta os valores das constantes de Henry calculados a partir dos valores de K obtidos e a equação 3.21. Os valores de H diminuem com a temperatura, isto mostra que a temperatura influencia no mecanismo de adsorção dos enantiômeros, os decréscimos são diferentes para cada enantiômero, mostrando que a retenção do enantiômero R é mais influenciada pela temperatura que o S. O aumento da temperatura provoca diminuições das interações dos solutos com a fase estacionária e também da viscosidade da fase móvel, levando uma diminuição dos seus tempos de retenção e assim de H. As constantes de Henry são parâmetros fundamentais para o projeto das condições operacionais do sistema LMS.

Tabela 5.7. Valores de H para os enantiômeros do mitotano em diferentes temperaturas.

T (°C)	H _S	H _R
25	2,33	2,62
35	1,92	2,11
45	1,65	1,79
55	1,31	1,40

5.6. Determinação dos parâmetros de transferência de massa

A eficiência da separação da coluna cromatográfica pôde ser avaliada a partir da análise de H , que é determinado a partir do número de pratos (N), por meio da equação 3.3. A Tabela 5.8 apresenta os valores de N nas faixas de vazões e temperaturas estudadas. Os altos valores de N alcançados revelam alta eficiência de separação da coluna, destacando valores superiores a 10000 para vazão de 1mL/min e temperatura de 45 °C. Observa-se que, a uma mesma vazão, os valores de N aumentam com o aumento da temperatura (exceto para a vazão de 0,5 mL/min), isso porque houve uma diminuição mais acentuada na largura da base do pico do que no tempo de retenção dos enantiômeros (equação 3.2). A uma temperatura de 25 °C os valores diminuíram com o aumento da vazão, isso ocorre uma vez que há diminuição do tempo de retenção dos enantiômeros. Para as temperaturas de 35 °C e de 45 °C primeiro há um aumento dos valores de N e depois uma diminuição, isso porque a velocidades muito baixas da fase móvel (0,5 mL/min) há uma maior difusão axial das moléculas de soluto na fase móvel, diminuindo a eficiência da separação.

O TTBB, por ser um composto inerte, não sofre interações com a FEQ e possui elevados valores de N . Dentro da faixa de temperatura e vazão empregadas na realização dos experimentos, os valores de N encontrados nos experimentos com o TTBB excederam 12000 pratos. Um prato equivale a um estágio de equilíbrio entre o soluto e a FEQ, e a FM. Com a elevação da temperatura mais estágios de equilíbrio acontecem, aumentando assim a eficiência de separação. Quanto mais largo for o pico e menor o tempo de retenção menor será o número de pratos com menor eficiência de separação.

Tabela 5.8. Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas.

Q (mL/min)	T(°C)	N _S	N _R	Q (mL/min)	T(°C)	N _S	N _R
0,5	25	9324	9411	3,0	25	4921	4800
	35	9253	8893		35	5661	5600
	45	8486	8374		45	5968	5730
1,0	25	9176	8900	4,0	25	3904	3867
	35	9629	9349		35	4603	4403
	45	10250	9684		45	4259	3670
2,0	25	6588	6366				
	35	7470	7236				
	45	8055	7820				

A partir dos valores apresentados na Tabela 5.8, a equação 3.3 foi utilizada para o cálculo dos valores de H . As Figuras 5.18, 5.19 e 5.20 mostram a dependência de H com a velocidade superficial de escoamento (u) para os enantiômeros S-(-) e R-(+), nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C, respectivamente. Para a faixa de vazão estudada observou-se que os termos A, B e C da equação de van Deemter (equação 3.25) foram considerados no ajuste. Experimentos com vazão de fase móvel menor que 0,5 mL/min não foram realizados pois os tempos para a realização desses seriam muito longos, o que demandaria um grande consumo de solvente.

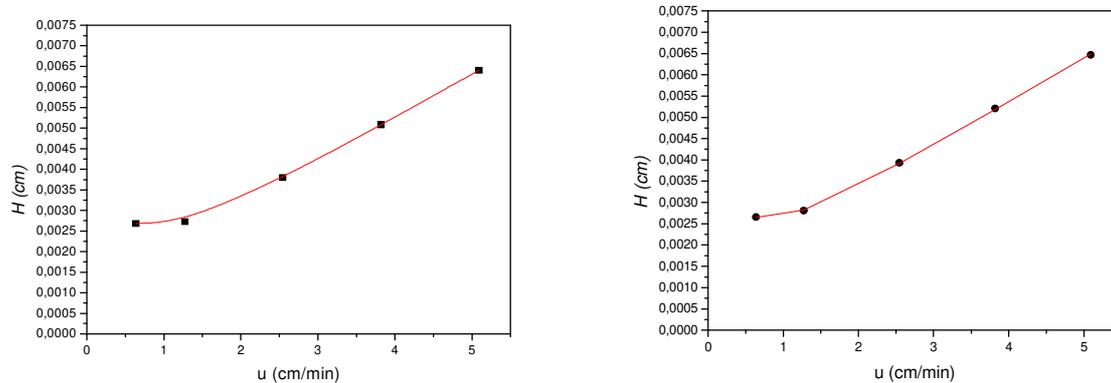


Figura 5.18. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S-(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de 25 °C.

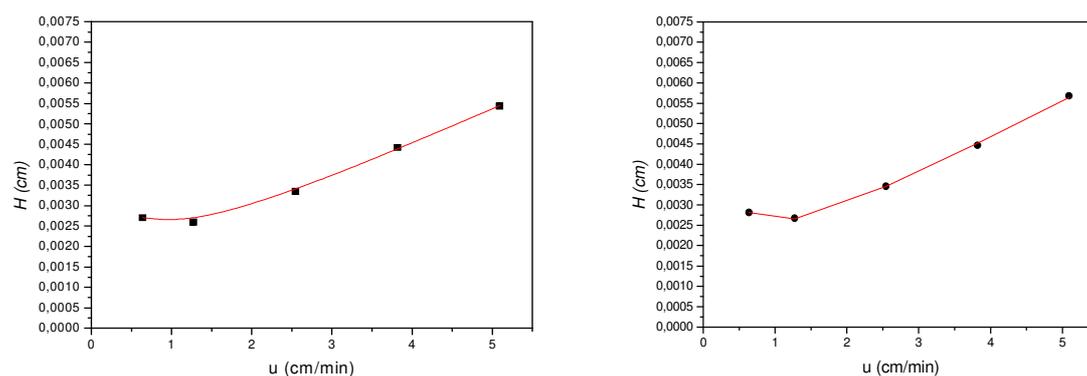


Figura 5.19. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S-(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de 35 °C.

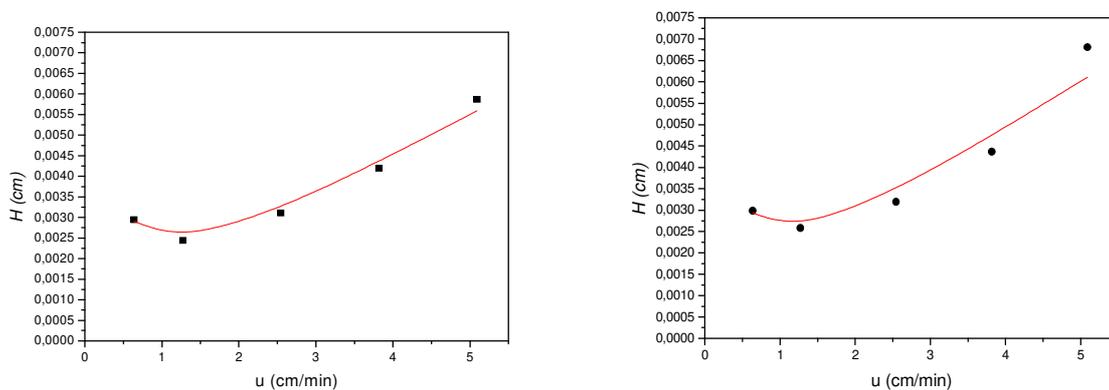


Figura 5.20. Curvas de van Deemter para os enantiômeros S(-) (símbolos ■) e R-(+) (símbolos ●) na temperatura de 45 °C.

Os parâmetros A, B e C da equação de van Deemter estão representados na Tabela 5.9 para os dois enantiômeros em diferentes temperaturas, juntamente com as respectivas estimativas dos desvios padrões.

Tabela 5.9. Parâmetros da equação de van Deemter para os enantiômeros do mitotano.

	S (-)		
T°C	A	B	C
25	$6,9 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-4} \pm 9,2 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 3,2 \times 10^{-6}$
35	$7,9 \times 10^{-4} \pm 7,0 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-4} \pm 5,0 \times 10^{-5}$	$8,8 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-5}$
45	$5,0 \times 10^{-4} \pm 8,8 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-4}$	$9,5 \times 10^{-4} \pm 1,9 \times 10^{-4}$
	R (+)		
T°C	A	B	C
25	$9,7 \times 10^{-4} \pm 6,0 \times 10^{-5}$	$6,4 \times 10^{-4} \pm 4,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-5}$
35	$6,8 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-4} \pm 9,0 \times 10^{-5}$	$9,4 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-5}$
45	$6,8 \times 10^{-4} \pm 1,8 \times 10^{-3}$	$9,2 \times 10^{-4} \pm 1,3 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3} \pm 3,9 \times 10^{-4}$

Os valores de A estão relacionados a difusão turbilhonar e também dependem dos diâmetros das partículas. Com o aumento da temperatura os valores de A devem aumentar devido a uma menor viscosidade da fase móvel o que ocasiona uma maior difusão turbilhonar das moléculas. A partir da Tabela 5.9 pode-se observar que A sofre pequenas variações com a temperatura. O termo B está relacionado à difusividade molecular. Quando a temperatura aumenta a difusividade das moléculas aumenta acarretando em um aumento do valor de B. Os valores de B presentes na Tabela 5.19 também sofrem pequenas variações com a temperatura. Os valores de C estão relacionados as constantes de equilíbrio e os coeficientes globais de transferência de massa. Ao aumentar-se a temperatura as constantes de equilíbrio diminuem como visualizado na Tabela 5.6. Os coeficientes globais de transferência de massa aumentam visto que a viscosidade da FM diminui, assim há uma menor resistência a transferência de massa. Portanto os valores de C devem diminuir com o aumento da temperatura de acordo com a equação 3.28. Os valores de C também não sofreram grandes variações nas temperaturas estudadas.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.9 pôde-se calcular os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L) e parâmetros de transferência de massa (k_m), mostrados na Tabela 5.10.

Os valores de D_L apresentaram-se relativamente baixos, demonstrando pouca influência da dispersão axial na eluição dos enantiômeros. Seus valores tiveram pouca variação com a temperatura indicando que para esse sistema a dispersão axial pode ser desprezada, mesmo a temperatura de 45 °C na qual com a elevação da temperatura os valores de D_L normalmente são maiores.

Tabela 5.10. Coeficientes de dispersão axial e parâmetro de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano.

T(°C)	S-(-)		R-(+)	
	$D_L(\text{cm}^2/\text{min})$	$k_m(\text{min}^{-1})$	$D_L(\text{cm}^2/\text{min})$	$k_m(\text{min}^{-1})$
25	$4,10 \times 10^{-4} + 3,45 \times 10^{-4}u$	341,96	$3,20 \times 10^{-4} + 4,85 \times 10^{-4}u$	334,41
35	$4,30 \times 10^{-4} + 3,95 \times 10^{-4}u$	456,02	$4,90 \times 10^{-4} + 3,40 \times 10^{-4}u$	411,90
45	$5,50 \times 10^{-4} + 2,50 \times 10^{-4}u$	442,86	$4,60 \times 10^{-4} + 3,40 \times 10^{-4}u$	410,37

A ordem de grandeza alcançada para k_m revela baixa resistência à transferência de massa para ambos os enantiômeros em seus processos de eluição pelo leito recheado nas temperaturas estudadas, favorecendo a alta eficiência da coluna quiral. O aumento da temperatura ocasiona um aumento na difusividade molecular o que acarreta em menor resistência a transferência de massa e assim maiores valores de k_m . Se experimentos a vazões mais baixas que 0,5 mL/min fossem realizados talvez os parâmetros da equação de van Deemter pudessem ser melhores estimados.

A Tabela 5.11 apresenta os valores de k_m para o mitotano, bupivacaína (SILVA JR., 2006) e rolipram (SARTOR, 2006) para efeitos comparativos de diferentes substâncias nos valores de transferência de massa global utilizando a mesma coluna cromatográfica.

As ordens de grandeza alcançadas para os valores de k_m são praticamente as mesmas para todas as três substâncias comprovando que a coluna possui uma baixa resistência a transferência de massa.

Tabela 5.11. Coeficientes de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano, bupivacaína e rolipram.

T(°C)	mitotano		bupivacaína		rolipram	
	$k_{mS}(\text{min}^{-1})$	$k_{mR}(\text{min}^{-1})$	$k_{mR}(\text{min}^{-1})$	$k_{mS}(\text{min}^{-1})$	$k_{mS}(\text{min}^{-1})$	$k_{mR}(\text{min}^{-1})$
25	342	334	199	150	290	220
35	456	412	250	210	385	317
45	443	410	330	290	444	367

5.7. Análise Termodinâmica

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção foram determinados pelo gráfico de van't Hoff, de acordo com as equações 3.31 e 3.33. Os coeficientes angulares e lineares dados pela relação linear do gráfico de $\ln k_i$ por $1/T$ permitem o cálculo da entalpia e entropia, respectivamente, para os enantiômeros no processo de transferência entre as fases móvel e estacionária. Esta relação, para vazão de 1 mL/min, é mostrada na Figura 5.21 utilizando a FM escolhida e na Figura 5.22 utilizando como fase móvel 95% de hexano e 5% de THF para efeitos comparativos.

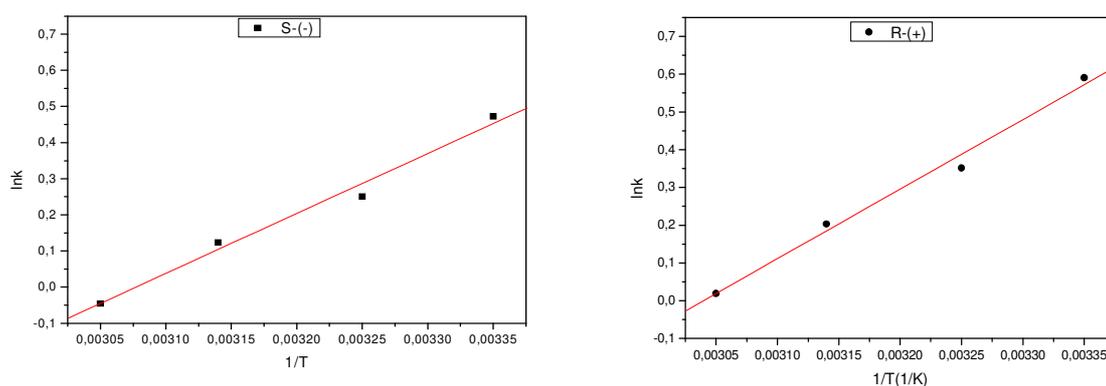


Figura 5.21. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, fase móvel 95% hexano e 5% acetato etila.

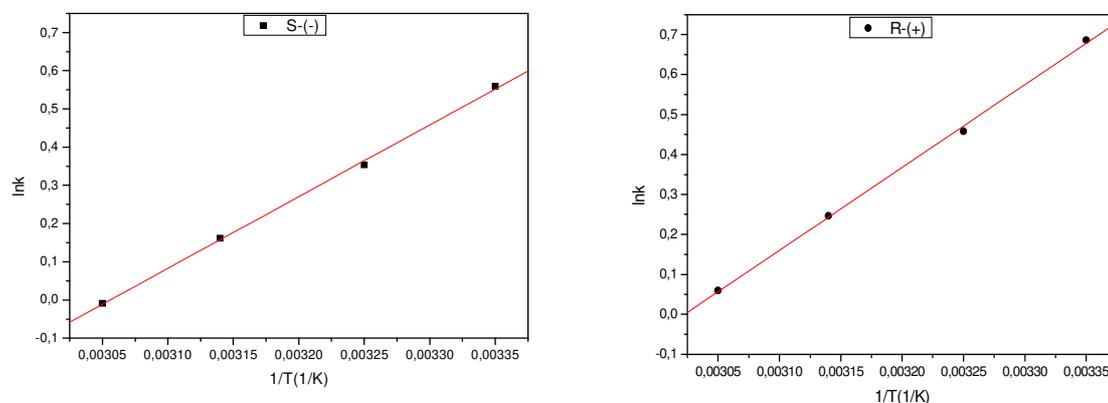


Figura 5.22. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, fase móvel 95% hexano e 5% THF.

Os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do mitotano.

	$\Delta H^{\circ}_S(\text{kJ/mol})$	$\Delta H^{\circ}_R(\text{kJ/mol})$	R^2	$\Delta S^{\circ}_S(\text{J/mol})$	$\Delta S^{\circ}_R(\text{J/mol})$	R^2
Acetato	-13,80	-15,31	0,992	-46,52	-50,59	0,994
THF	-15,60	-17,22	0,999	-51,72	-56,11	0,999

Os coeficientes de correlação (R^2) apresentados na Tabela 5.12 demonstram que os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir de retas bem ajustadas aos dados experimentais. Os valores negativos de ΔH° indicam que é favorável energeticamente ao soluto adsorver-se à fase estacionária. Os valores negativos mais acentuados utilizando como modificador o THF é devida uma maior interação adsortiva dos enantiômeros ao utilizar essa fase móvel, ocasionando um maior tempo de residência dos enantiômeros na coluna. Os valores negativos mais acentuados para o enantiômero R-(+) são por conta de

uma maior interação adsorptiva. Os valores negativos de ΔS° são indicativos de um aumento de ordem do sistema cromatográfico quando o soluto é transferido da fase móvel para a fase estacionária. Os valores negativos mais acentuados utilizando como modificador o THF mostra que esse aumento de ordem é maior ao se utilizar essa FM.

A diferença relativa na separação dos enantiômeros é observada pelo gráfico de $\ln \alpha$ em função de $1/T$, como é mostrado na Figura 5.23

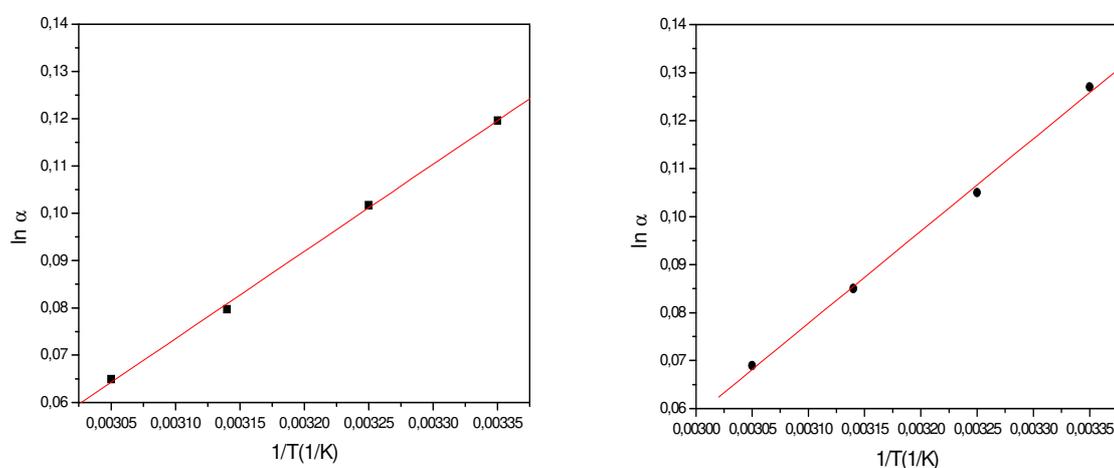


Figura 5.23. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do mitotano com a temperatura, modificador acetato de etila (símbolos ■) e modificador THF (símbolos ●).

Tabela 5.13. Parâmetros termodinâmicos e temperatura enantiosseletiva.

	$\Delta\Delta H^\circ_s(\text{kJ/mol})$	$\Delta\Delta S^\circ_s(\text{J/mol})$	$T_{\text{iso}}(\text{K})$	R^2
Acetato	-1,53	-4,14	370,11	0,999
THF	-1,60	-4,30	371,05	0,998

Os coeficientes de correlação apresentados na Tabela 5.13 demonstram que os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir de retas bem ajustadas aos dados

experimentais. Os valores negativos de $\Delta\Delta H^\circ$ e $\Delta\Delta S^\circ$ significam que a enantioseparação é controlada entalpicamente. A temperatura isoenantiosseletiva calculada foi de 96,85 °C e 97,90 °C para o modificador acetato de etila e THF, respectivamente. Isso significa que a partir desta temperatura há uma inversão na ordem de eluição dos enantiômeros. No entanto, experimentos nesta temperatura não são convenientes, pois podem degradar o soluto e danificar o recheio da coluna. Como a faixa de temperatura utilizada é menor que a T_{iso} , isso também indica que o sistema é controlado por efeitos entálpicos.

A análise dos parâmetros de transferência de massa, bem como dos parâmetros termodinâmicos revelaram que o fenômeno limitante para a separação dos enantiômeros do mitotano na fase estacionária em estudo é dado pelo equilíbrio de adsorção, uma vez que a resistência à transferência de massa é baixa.

5.8. Isotermas de adsorção

A partir das curvas de isotermas de adsorção, pode-se obterem informações a respeito do equilíbrio que se estabelece para os enantiômeros, entre as fases móvel e estacionária, durante a passagem pelo leito recheado. Os experimentos para a obtenção das isotermas foram realizados utilizando-se o método da análise frontal, na temperatura de 25 °C e vazão de 1,0 mL/min.

As frentes de adsorção e dessorção na eluição dos enantiômeros pela coluna cromatográfica podem ser observadas na Figura 5.24.

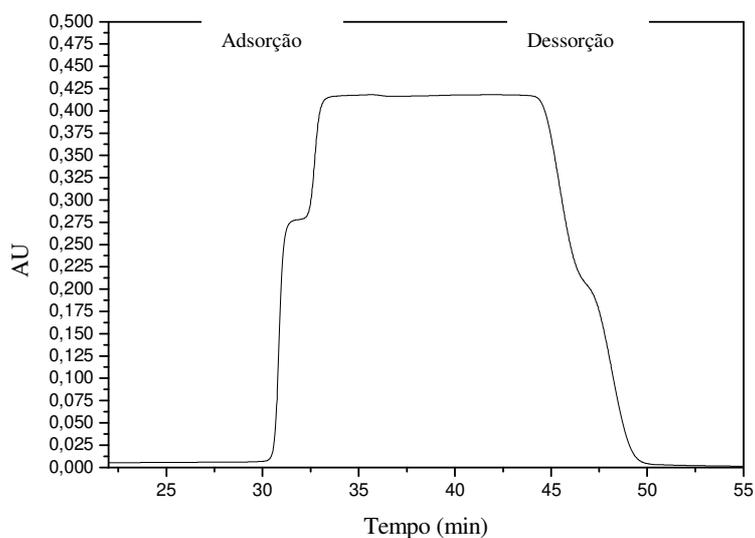


Figura 5.24. Curvas de ruptura para os enantiômeros do mitotano com concentração de alimentação de 1g/L.

A partir da Figura 5.24 pode-se observar que há um rápido deslocamento praticamente sem inclinação, até a formação do platô intermediário. Durante a formação desse platô intermediário, apenas o enantiômeros menos retido foi eluído. Antes da completa saturação da coluna (antes de atingir o equilíbrio), há um novo deslocamento, com a eluição de ambos os enantiômeros. Na etapa de dessorção também foi observada a formação de um platô intermediário correspondente ao enantiômero mais retido. Estes comportamentos foram observados para todos os experimentos realizados nas diferentes concentrações estudadas, porém com o platô intermediário mais visível a baixas concentrações.

As isotermas de equilíbrio obtidas para os enantiômeros do mitotano na temperatura de 25 °C e vazões de 1mL/min são apresentadas na Figura 5.25. A concentração de soluto adsorvida na fase estacionária (q) em equilíbrio com a concentração de soluto na fase móvel (c), para cada enantiômero foi calculada pela equação 3.46.

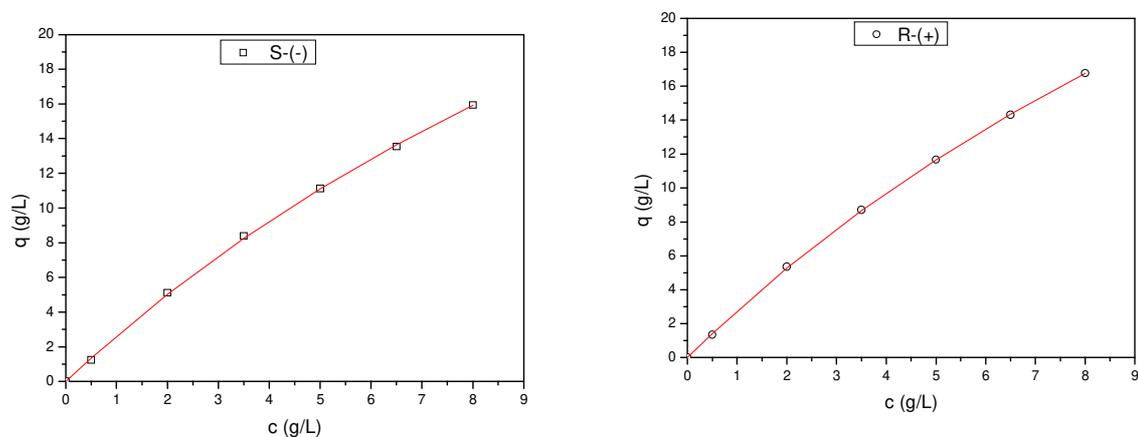


Figura 5.25. Isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano obtidos pelo método da análise frontal.

Os pontos experimentais foram ajustados por um modelo de Langmuir para os dois enantiômeros. A Tabela 5.14 apresenta os resultados referentes aos coeficientes a e b da equação 3.47 com suas respectivas estimativas dos desvios padrões, bem como a capacidade de saturação da fase estacionária (q_{sat}).

Tabela 5.14. Coeficientes da isoterma dos enantiômeros do mitotano.

	a	b (L/g)	q_{sat} (g/L)
S(-)	$2,75 \pm 0,06$	$0,048 \pm 0,005$	57,67
R(+)	$2,88 \pm 0,04$	$0,047 \pm 0,003$	61,53

Comparando-se os valores de a da Tabela 5.14 com os valores das constantes de Henry da Tabela 5.7, o erro relativo para o enantiômero S(-) foi igual a 18% e para o R (+) igual a 10 %. Esses erros estão relacionados provavelmente ao método de estimativa dos parâmetros da isoterma.

5.9. Estudo de sobrecarga

5.9.1 Operação em batelada

A Figura 5.26 apresenta os cromatogramas obtidos para as diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica (c_F) (10 g/L, 50 g/L e 100 g/L). Os experimentos foram conduzidos com injeção de 20 μ L da amostra e vazão de 1 mL/min. Pode-se notar leve diminuição nos tempos de retenção à medida que a concentração foi aumentada. Estes resultados já eram esperados, pois com o aumento da concentração há maior quantidade de moléculas competindo pelos sítios de adsorção disponíveis e a saturação da coluna tende a acontecer mais rapidamente. Observando a largura dos picos na base, nota-se que houve um leve aumento, aumentando a assimetria.

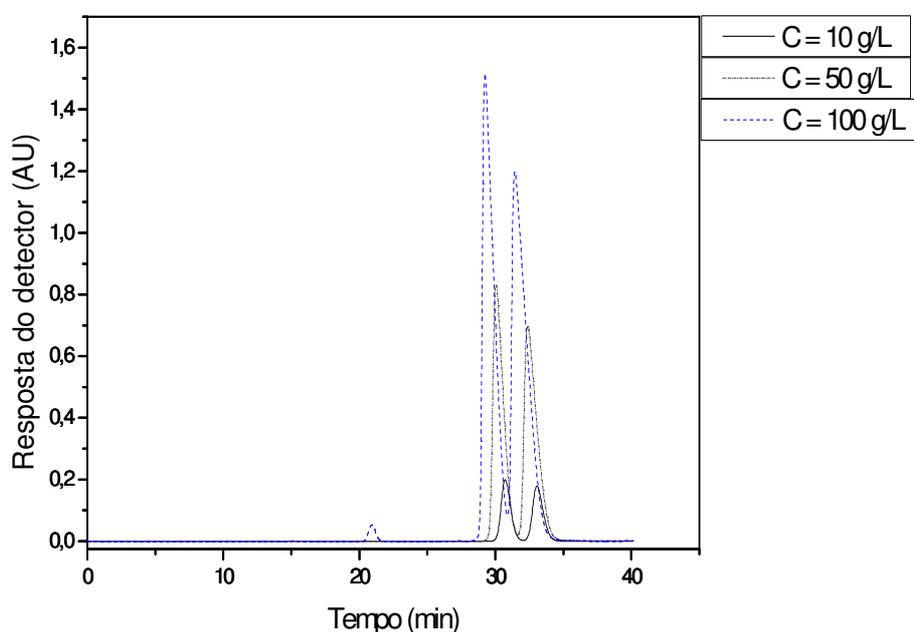


Figura 5.26. Cromatogramas obtidos na separação da mistura enantiomérica em diferentes concentrações de alimentação.

A partir dos cromatogramas obtidos com o estudo de sobrecarga foram calculadas as variáveis desempenho dadas pelas equações 3.49 e 3.50 para avaliar a separação em batelada. Para isso foram calculadas as concentrações e as massas de cada enantiômero como função do tempo através da resolução numérica da equação 3.42 juntamente com a condição inicial (equação 3.44), as condições de limite (equações 3.45 e 3.48) e os parâmetros das isotermas. As variáveis desempenho para as concentrações da mistura racêmica de 10, 50 e 100 g/L estão apresentadas na Figura 5.27. Cada ciclo corresponde a uma injeção da mistura racêmica.

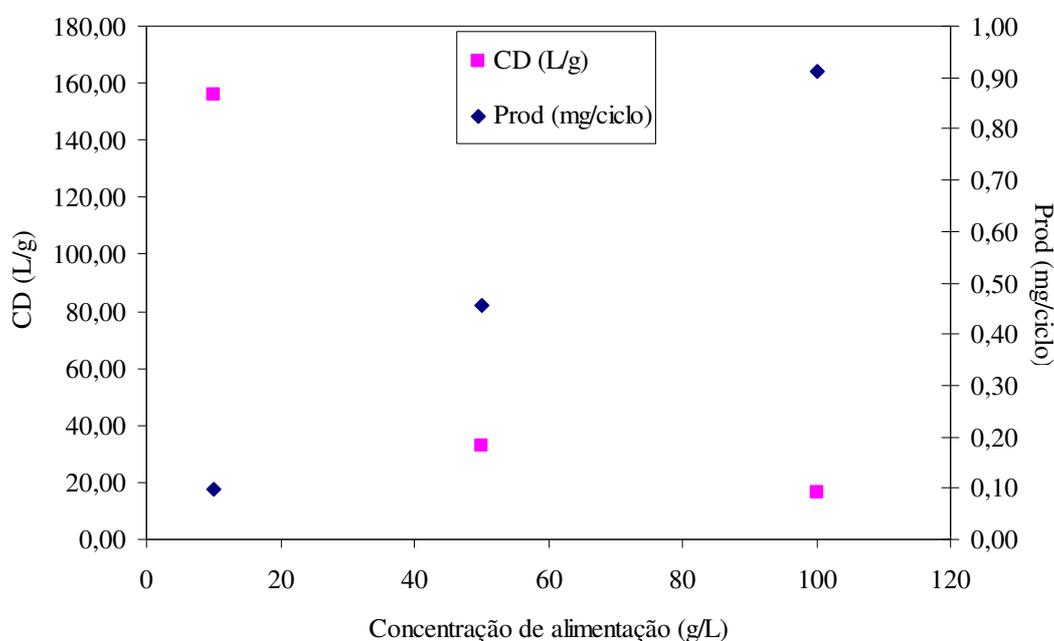


Figura 5.27. Consumo de dessorvente e produtividade em função da concentração de alimentação da mistura racêmica.

A Tabela 5.15 apresenta as produtividades de cada enantiômero em gramas por dia em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação. Os cálculos foram realizados para operações em bateladas seguidas, para isso faz-se necessário o uso de um equipamento de HPLC que possua coletores para as frações de saída e injeções automáticas

da amostra com intervalo de tempo programado entre uma injeção e outra.

Tabela 5.15. Produtividade de cada enantiômero em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para operação em batelada.

c_F (g/L)	Prod (g/dia)
10	0,009
50	0,044
100	0,087

5.9.2. Estudo visando à separação contínua em Leito Móvel Simulado

A região de separação dos enantiômeros foi determinada pela teoria do equilíbrio (método do triângulo) para equilíbrio linear e não linear. Essa teoria foi utilizada visto que as colunas do tipo Kromasil CHI-TBB são colunas muito eficientes como pôde ser visto na Tabela 5.8, através do elevado número de pratos (N). Devido aos valores elevados de N e k_m e aos baixos valores de D_L pode-se desprezar os efeitos de dispersão e de resistência a transferência de massa e assim adotar a teoria do triângulo. Foram geradas várias regiões de separação no plano (m_2 , m_3) para diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica (c_F) (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 g/L). Estas regiões são apresentadas na Figura 5.28.

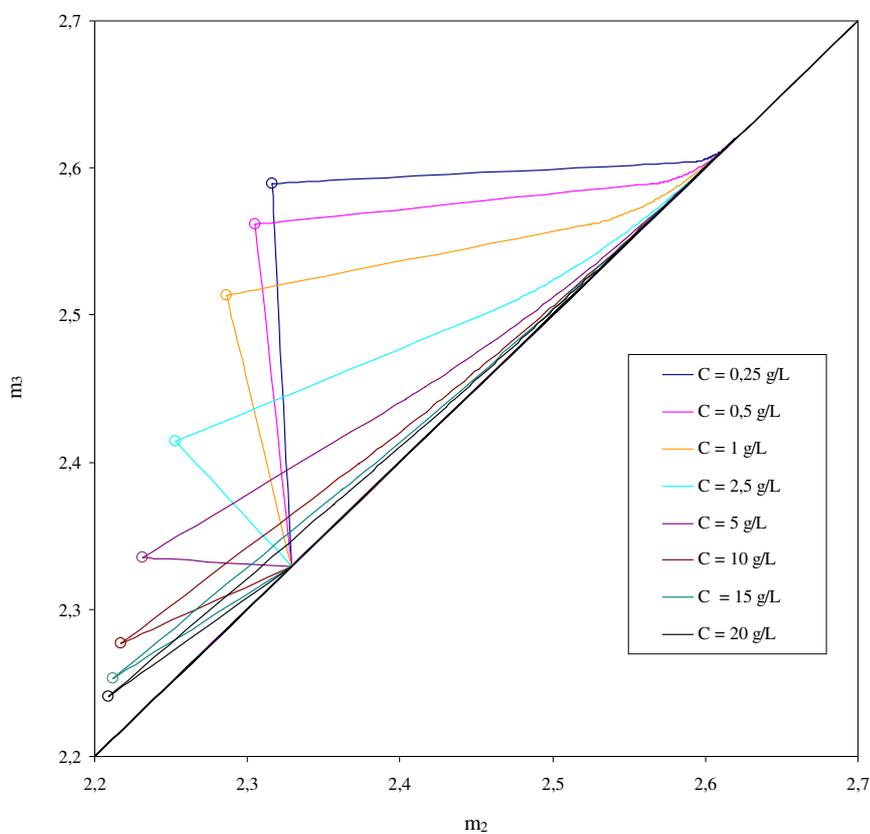


Figura 5.28. Regiões de separação dos enantiômeros no plano (m_2, m_3) de acordo com a teoria do equilíbrio para várias concentrações de alimentação da mistura racêmica.

Os pontos nos vértices dos triângulos representam as condições de operação ótimas de separação em termos de consumo de solvente e produtividade por unidade de massa de fase estacionária. A Tabela 5.16 apresenta os valores de m_2 e m_3 para as diferentes concentrações de mistura racêmica nesses pontos ótimos.

Tabela 5.16. Valores de m_2 e m_3 obtidos pela teoria do triângulo nas condições de operação ótimas.

c_F (g/L)	m_2	m_3	$m_3 - m_2$
0,25	2,32	2,59	0,27
0,50	2,30	2,56	0,26
1,00	2,29	2,51	0,23
2,50	2,25	2,41	0,16
5,00	2,23	2,34	0,10
10,00	2,22	2,28	0,06
15,00	2,21	2,25	0,04
20,00	2,21	2,24	0,03

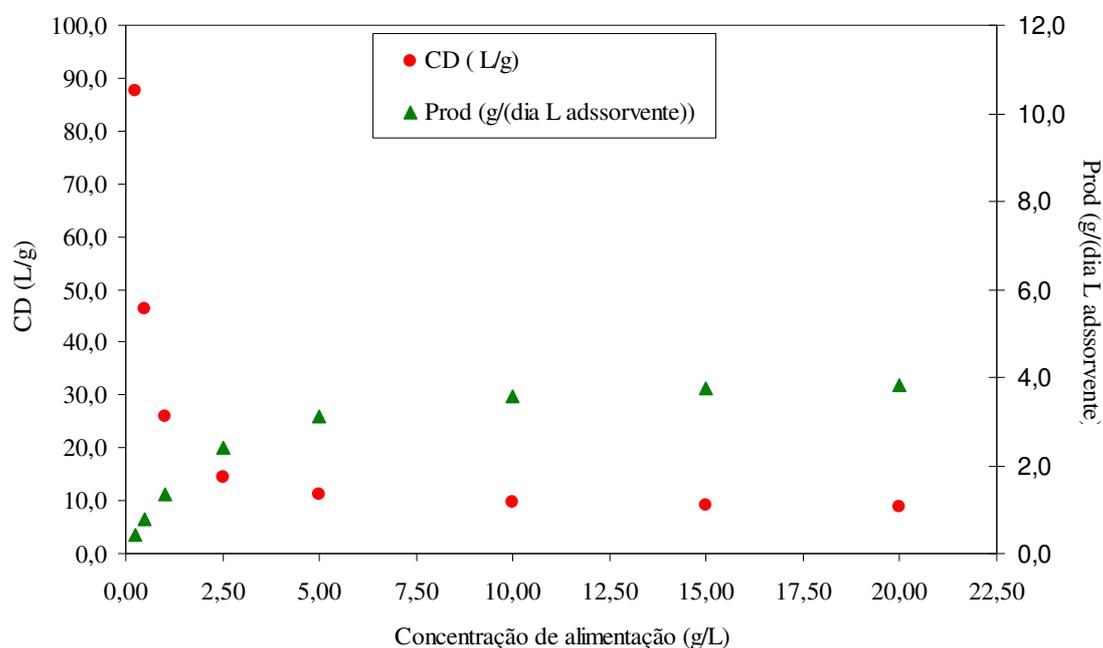
Pode-se observar que com o aumento na concentração de alimentação da mistura a intersecção da região de completa separação com a diagonal no plano (m_2, m_3) permanece a mesma para qualquer valor de concentração na alimentação. Quando os pontos de operações se tornam mais próximos da diagonal a diferença entre m_3 e m_2 se aproxima de zero, assim como a vazão de alimentação. Sob essas condições, apesar da concentração da mistura ser maior, a concentração dos componentes a serem separados dentro da unidade é pequena. Quando a concentração de alimentação aumenta, a posição do ponto de operação ótimo muda movendo-se em direção ao canto esquerdo inferior do plano (m_2, m_3) . Ao mesmo tempo a região de completa separação se torna pequena e ‘afinada’ com uma longa cauda orientada em direção ao canto superior direito do plano (m_2, m_3) .

Outras informações importantes referentes ao ponto de operação ótimo podem ser obtidas através do cálculo da produtividade e do consumo de solvente quando a concentração de alimentação aumenta. Com os valores de m_2 e de m_3 calcularam-se as vazões nas seções 2 e 3, respectivamente de acordo com a Equação 3.52. Para calcular as vazões das seções 1 e 4, atribuíram-se valores as vazões nessas seções e calcularam-se os valores de m_1 e de m_4 pela mesma Equação 3.52, de tal forma que eles obedecessem as restrições dadas pela Equação 3.53. Os resultados para um mesmo tempo de troca (t^*) de 15 minutos, vazão na seção 1 e na seção 4 estão apresentados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17. Vazões nas seções para diferentes concentrações de alimentação.

c_F (g/L)	Q_1 (mL/min)	Q_2 (mL/min)	Q_3 (mL/min)	Q_4 (mL/min)	Q_R (mL/min)	Q_E (mL/min)	Q_F (mL/min)
0,25	3,00	2,10	2,25	1,00	1,25	0,90	0,14
0,50	3,00	2,10	2,23	1,00	1,23	0,90	0,14
1,00	3,00	2,09	2,21	1,00	1,21	0,91	0,12
2,50	3,00	2,07	2,15	1,00	1,15	0,93	0,08
5,00	3,00	2,06	2,11	1,00	1,11	0,94	0,05
10,00	3,00	2,05	2,08	1,00	1,08	0,95	0,03
15,00	3,00	2,05	2,07	1,00	1,07	0,95	0,02
20,00	3,00	2,05	2,06	1,00	1,06	0,95	0,02

A Figura 5.29 apresenta a produtividade de cada enantiômero em gramas por dia e litro de adsorvente (Prod) e consumo de dessorvente (CD), calculados a partir das equações 3.67 e 3.66, respectivamente, para as condições da Tabela 5.17.

**Figura 5.29.** Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação.

Pode-se observar que quanto maior a concentração de alimentação para um mesmo tempo de troca e vazões nas seções 1 e 4, maior produtividade e menor consumo de solvente para concentrações até 10 g/L, para concentrações maiores os valores de Prod e CD sofrem pequenas variações. Assim, concentrações ótimas de trabalhos estariam entre 5 e 10 g/L para essas condições de operação.

Ao aumentar-se o tempo de troca para 20 minutos com vazões nas seções 1 e 4 inalteradas ($Q_1 = 3 \text{ mL/min}$ e $Q_4 = 1,0 \text{ mL/min}$) percebe-se que CD aumenta e a Prod diminui para todas as concentrações. Um aumento no tempo de troca gera uma diminuição na vazão de alimentação (Equação 3.54) o que conseqüentemente diminui a produtividade. Como a alimentação na seção 1 permanece a mesma o consumo de solvente aumenta. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 5.30.

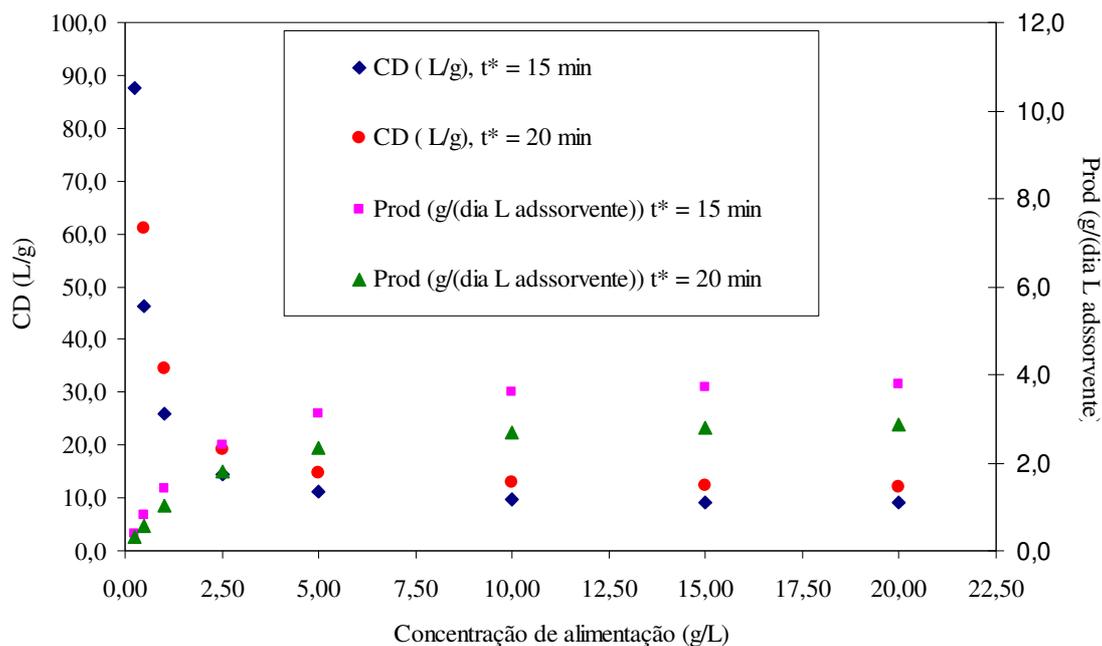


Figura 5.30. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando t^* .

Um aumento na vazão na seção 1 ($Q_1 = 4,0 \text{ mL/min}$), mantendo-se o tempo de

troca ($t^* = 15$ min) e a vazão na seção 4 ($Q_4 = 1,0$ mL/min) inalterados, acarreta em um aumento no consumo de dessorvente enquanto que a produtividade permanece a mesma, porém observa-se uma aumento da corrente de extrato. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 5.31.

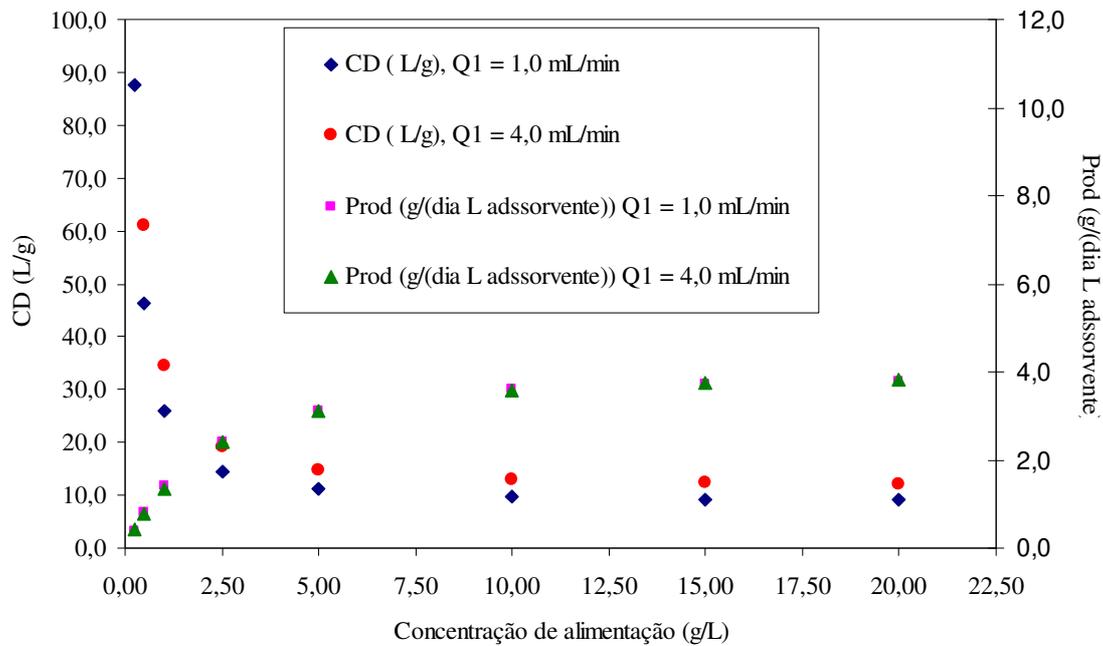


Figura 5.31. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando Q_1 .

Um aumento na vazão na seção 4 ($Q_4 = 1,5$ mL/min), mantendo-se o tempo de troca ($t^* = 15$ min) e a vazão na seção 1 ($Q_1 = 3,0$ mL/min) inalterados, acarreta em uma diminuição da vazão de refinado, enquanto que a produtividade e o consumo de dessorvente permanecem constantes. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 5.32.

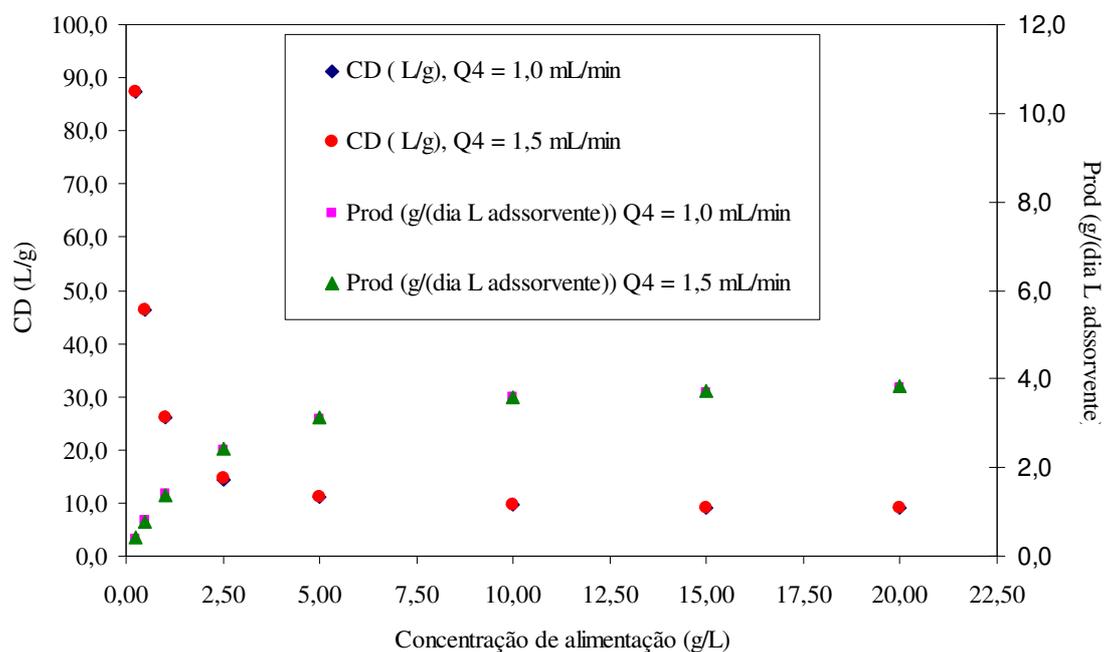


Figura 5.32. Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação variando Q_4 .

A Tabela 5.18 apresenta as produtividades em gramas de cada enantiômero por dia em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para a condição de tempo de troca de 15 minutos, $Q_1 = 3,0$ mL/min e $Q_4 = 1,0$ mL/min.

Tabela 5.18. Produtividade em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para um sistema LMS com colunas de diâmetro de 1cm.

c_F (g/L)	Prod (g/dia)
0,25	0,026
0,50	0,049
1,00	0,086
2,50	0,153
5,00	0,198
10,00	0,226
15,00	0,236
20,00	0,242

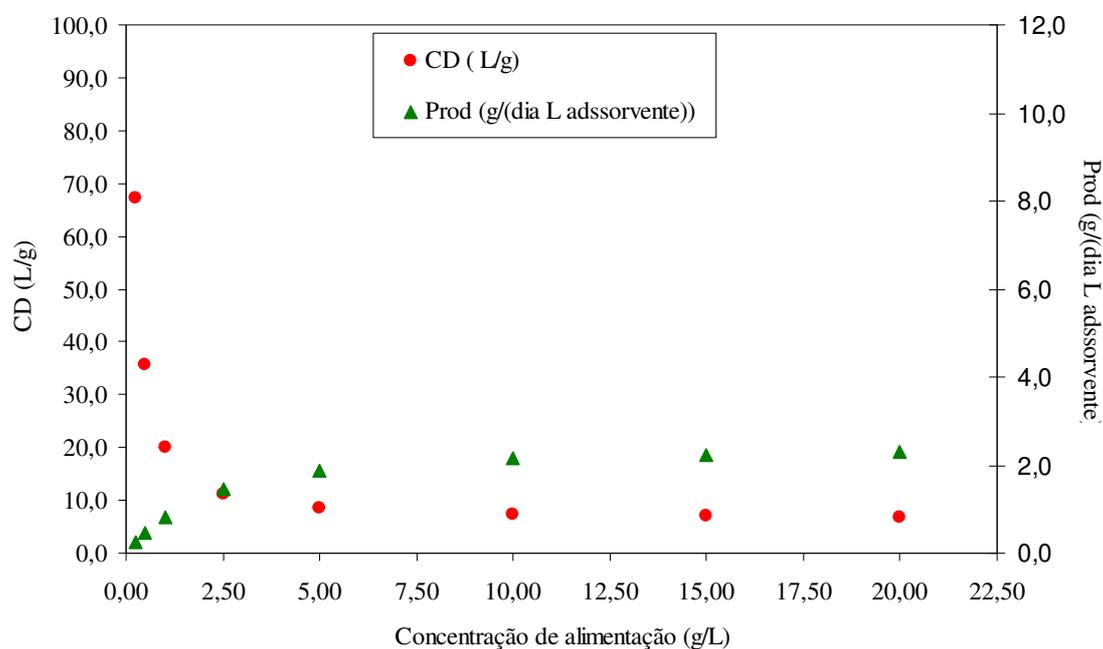
Um aumento de escala pode ser realizado aumentando-se o diâmetro das colunas utilizadas na unidade LMS, colunas Kromasil CHI-TBB de diâmetro de 5 cm e comprimento de 25 cm são comercializadas. Foi feito um estudo para verificar o aumento de produtividade ao utilizarem-se colunas desse tipo. Os diferentes planos (m_2 , m_3) gerados pela teoria do equilíbrio permanecem inalterados ao mudarem-se apenas os diâmetros das colunas a serem utilizadas na unidade. Segundo Ludemann-Hombourger (2002) e Zenoni *et al.* (2002) os parâmetros de adsorção e hidrodinâmica de coluna de dimensões menores podem ser diretamente usados no projeto de aumento de escala para colunas com a mesma FEQ.

As vazões obtidas, utilizando uma coluna de 5 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento, para um tempo de troca de 25 minutos estão apresentadas na Tabela 5.19.

Tabela 5.19. Vazões nas seções para diferentes concentrações de alimentação.

c_F (g/L)	Q_1 (mL/min)	Q_2 (mL/min)	Q_3 (mL/min)	Q_4 (mL/min)	Q_R (mL/min)	Q_E (mL/min)	Q_F (mL/min)
0,25	34,00	30,08	32,24	15,00	17,24	3,92	2,15
0,50	34,00	29,99	32,02	15,00	17,02	4,01	2,03
1,00	34,00	29,85	31,64	15,00	16,64	4,15	1,79
2,50	34,00	29,59	30,86	15,00	15,86	4,41	1,27
5,00	34,00	29,41	30,23	15,00	15,23	4,59	0,82
10,00	34,00	29,30	29,77	15,00	14,77	4,70	0,47
15,00	34,00	29,26	29,59	15,00	14,59	4,74	0,33
20,00	34,00	29,24	29,49	15,00	14,49	4,76	0,25

A Figura 5.33 apresenta a produtividade (Prod) e consumo de dessorvente (CD) para as condições da Tabela 5.19.

**Figura 5.33.** Consumo de dessorvente e produtividade de cada enantiômero em função da concentração de alimentação.

Pode-se notar observando a Figura 5.33 que o consumo de dessorvente diminui e a produtividade por litro de dessorvente também diminui ao aumentar-se o diâmetro das colunas de 1 cm para 5 cm.

A Tabela 5.20 apresenta as produtividades em gramas de cada enantiômero por dia em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação, para a condição de tempo de troca de 25 minutos, $Q_1 = 34,0$ mL/min e $Q_4 = 15,0$ mL/min.

Tabela 5.20. Produtividade em diferentes concentrações da mistura racêmica na alimentação para um sistema LMS com colunas de diâmetro de 5cm.

c_F (g/L)	Prod (g/dia)
0,25	0,39
0,50	0,73
1,00	1,29
2,50	2,29
5,00	2,96
10,00	3,39
15,00	3,54
20,00	3,62

Pode-se verificar na Tabela 5.20 que há um aumento significativo da produtividade ao aumentar-se o diâmetro das colunas. Experimentos realizados em cromatografia contínua (Leito móvel simulado) produzem produtividades maiores que os realizados em sistema em batelada como pôde ser observado nas Tabelas 5.15 e 5.18.

6. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

6.1. Conclusões

Os resultados alcançados com o trabalho demonstraram a separação dos enantiômeros do mitotano na fase estacionária O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida, com elevada eficiência. A fase móvel definida como mais adequada para os experimentos baseou-se em 95% hexano e 5% acetato de etila. Com o auxílio do dicroísmo circular pôde-se verificar que o enantiômero menos retido na coluna cromatográfica trata-se do S-(-)-mitotano e o mais retido do R-(+)-mitotano.

Os parâmetros cromatográficos demonstraram um bom potencial de separação do enantiômeros, com fator de separação médio de 1,13 e resoluções próximas a 1,50. Os coeficientes de transferência de massa k_m e coeficiente de dispersão axial D_L foram determinados neste trabalho e se apresentaram favoráveis à separação com relativa baixa resistência à transferência de massa quando comparados com valores similares obtidos por outros autores para as substâncias rolipram e bupivacaína na separação usando a mesma fase estacionária utilizada nessa dissertação.

A vazão de fase móvel e a temperatura foram variáveis importantes na determinação da resolução da separação. As melhores resoluções e eficiências da mistura racêmica do mitotano foram alcançadas em condições de vazão de 1mL/min e de temperatura igual a 25 °C.

Os valores negativos para as grandezas termodinâmicas entalpia e entropia comprovaram que o processo de separação é favorável energeticamente para que os solutos sejam adsorvidos à fase estacionária. A adsorção ocorre com o predomínio da energia entálpica em relação à entrópica.

As isotermas de adsorção adequaram-se bem ao ajuste do modelo de Langmuir.

Analisando-se em termos de variáveis desempenho (produtividade e consumo de dessorvente) para diferentes concentrações de alimentação da mistura racêmica, pode-se concluir que um sistema de cromatografia contínuo (Leito móvel simulado) apresentou uma

maior produtividade com menor consumo de solvente se comparado a um sistema de cromatografia em batelada. Para operações em batelada com alimentação da mistura racêmica de 100 g/L atingiu-se uma produtividade de 0,087 gramas de enantiômero por dia. Já para um sistema contínuo para um concentração de alimentação da mistura racêmica de 10 g/L obteve-se uma produtividade de 0,226 gramas de enantiômero por dia.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros ou relacionados fica como sugestão à realização de experimentos de separação do mitotano no sistema LMS com a finalidade de se obterem os enantiômeros, tendo como base às condições operacionais descritas nesse trabalho. Avaliar o desempenho de separação do mitotano em colunas com fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, comercialmente conhecida como Chiralpak AD., que está sendo desenvolvida por Freitas como parte de seu trabalho de doutorado.

Tendo a possibilidade de obtenção de quantidades significativas de mitotano, determinar o efeito competitivo dos enantiômeros pelos sítios de adsorção para região não linear da isoterma de adsorção. Com esses resultados avaliar o ajuste a diferentes modelos de isoterma, principalmente Langmuir competitivo.

Avaliar a separação do mitotano em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência com reciclo, tendo em vista a quantidade produzida de enantiômero puro ao se comparar com um sistema em batelada.

Realizar um estudo de sobrecarga na coluna por meio da variação do volume de injeção e verificar como esse influência na separação e nas variáveis desempenho.

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, F.; BAKKE, S.; RUTT, A. *et al.* A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma. *Cancer*, v. 94, n. 9, p. 2333-2343, 2002.

AHUJA, S. *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1991. 239 p.

AHLMAN, H.; KHORRAM-MANESH, A.; JANSSON, S. *et al.* Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. *World J Surg*, v. 25, n. 7, p. 927-933, 2001.

ALI, I. GUPTA, V. K., ABOUL-ENEIN, H. Y., Chirality: a challenge for the environmental scientists, *Current Science*, v. 84, n. 2, p. 152-156, 2003.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of chiral ratio of o,p-DDT and o,p-DDD pesticides on polysaccharides chiral stationary phases by HPLC under reversed-phase mode. *Wiley Periodicals, Inc.*; p. 329-333, 2002.

ALI, I.; GUPTA, V. K.; ABOUL-ENEIN, H. Chirality: a challenge for the environmental scientists. *Current Science*, v. 84, n.2, p. 152-156, 2003.

ALLINGER, N. D. *Química orgânica*, Guanabara Dois, 3 edição, Rio de Janeiro, 1983.

ANDERSEN, A.; KASOERKIK-ZALUSKA, A.A.; WARREN, D.J. Determination of Mitotane (o-p'-DDD) and its Metabolites o-p'-DDA and o-p'-DDE in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit*, v. 21, n. 3, p. 335-340, 1999.

ANDERSEN, A.; WARREN, D.J.; NOME, O. *et al.* A high-pressure liquid chromatography method for measuring mitotane [1,1-(o-p'-dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethane] and its metabolite 1,1-(o-p1'-Dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethene in plasma. *Ther Drug Monit*, v. 17, n. 5, p. 526-531, 1995.

ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S. G. Preparative chiral chromatography resolution of enantiomers in drug discovery. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 54, p. 11-23, 2002.

ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.; MÖLLER, P.; PERSSON, B.; SANCHEZ, D. Chromatographic separation of enantiomers on N,N'-diallyl-L-tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 741, p. 23-31, 1996.

ANDERSSON, S.; BALMÉR, K.; PERSSON, B. Chromatographic resolution of organic acids using the Kromasil-CHI-TBB chiral stationary phase. *Chirality*, v. 11, p. 420-425, 1999.

ANON. Market trends in chiral separations. Universal Pharma Technologies LLC Report, North Andover, MA, 1997.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. *Chemical Engineering Journal*, v. 30, p. 25-36, 1985a.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. *Journal of Chromatography*, v. 330, p. 159-166, 1985b.

BAUDIN, E.; PELLEGRITI, G.; BONNAY, M. *et al.* Impact of Monitoring Plasma 1,1-Dichlorodiphenilcichloroethane (o,p'DDD) Levels on the Treatment of Patients with Adrenocorgical Carcinoma. *Cancer*, v. 92, n. 6, p. 1385-1392, 2001.

BURGER, D.; NEUMULLER, R.; YANG, G. L.; ENGELHARDT, H.; QUINONES, I.; GUIOCHON, G. Determination and comparison of competitive isotherms by frontal analyses and frontal velocity analyses. *Chormatographia*, v. 51, n. 9/10, p. 517-525, 2000.

BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; PIA, A. *et al.* Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer*, v. 83, n. 10, p. 2194-2200, 1998.

BERTHOD, A.; HE, B. L.; BEESLEY, T. E. Temperature and enantioseparation by macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1060, p. 205-214, 2004.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; PORCEL, M. Use of circular dichroism and artificial neural networks for the kinetic-spectrophotometric resolution of enantiomers. *Analytica Chimica Acta*, v. 431, p. 115-123, 2001.

BÖCKER, S.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M.; FLEURY, C.; SCHENKEL, B. Design of chromatographic separations on reversed phase. *Separation Science and Technology*, v. 37, n. 7, p. 1725-1745, 2002.

BOLLEN, E.; LANSER, J.B.K. Reversible mental deterioration and neurological disturbances with o,p'-DDD therapy. *Clin Neurol Neurosurg*, v. 94, p. S49-S51, 1992.

BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, São Paulo, 2006. 453 p.

BUSER, H. R.; MÜLLER, M. D. Isomer-selective and enantiomeraselective determination of DDT and related compounds using chiral high-performance gas chromatography/mass spectrometry and chiral high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, v. 67, n. 15, p. 2691-2698, 1995.

CAI, W.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T. *et al.* Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. *J Pharm Sciences*, v. 84, n. 2, p. 134-1389, 1995.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: Editora da UFSCar, Série Apontamentos, 2001.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; GUIOCHON, G. Study of the adsorption equilibria of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate using a microbore column. *Journal of Chromatography A*, v. 953, p. 55-66, 2002.

COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, nº3, 2001

COX, G. B. Preparative enantioselective chromatography. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, United Kingdom, 2005. 330 p.

CREMASCO, M. A.; HRITZKO, B. J.; XIE, Y.; WANG, N. H. L. Parameters estimation for amino acids adsorption in fixed bed by moment analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 18, n. 2, p. 181-194, 2001.

DICKSTEIN, G.; SHECHNER, C.; ARAD, E.; *et al.* Is there a Role for Low Doses of Mitotane (o,p'-DDD) as Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 83, n. 9, p. 3100-3103, 1998.

DUAN, G.; CHING, C. B.; SWARUP, S. Kinetic and equilibrium study of the separation of propranolol enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral adsorbent. *Chemical Engineering Journal*, v. 69, p. 111-117, 1998.

DUNGELOVÁ, J.; LEHOTAY, J.; KRUPČÍK, J.; CIŽMÁRIK, J.; ARMSTRONG, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation. Part VI: thermodynamic study of HPLC separation of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a (S,S) Whelk-O 1 column. *J. Sep. Sci.*, v. 27, p. 983-990, 2004.

EKA CHEMICALS; <<http://www.kromasil.com/products/products/chiral/index.html>>.

FELINGER, A.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Numerical determination of the competitive isotherms of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, v. 986, p. 207-225, 2003.

FORNSTEDT, T.; SAJONZ, P.; GUIOCHON, G. A closer study of chiral retention mechanisms. *Chirality*, v. 10, p. 375-381, 1998.

FRANCOTTE, E. R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drugs enantiomers. *Journal of Chromatography A*, v. 906, p. 379-397, 2001.

FRANCOTE, E.; RICHERT, P.; MAZZOTI, M.; MORBIDELLI. Simulated moving bed chromatography resolution of chiral antitussive, *Journal of Chromatography A*, v. 796, 239-248, 1998.

GÖTMAR, G.; ALBAREDA, N. R.; FORNSTEDT, T. Investigation of the heterogeneous adsorption behavior of selected enantiomers on immobilized α_1 -acid glycoprotein. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 13, p. 2950-2959, 2002.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 965, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Boston: Academic Press, MA, 1994. 323 p.

GRAFF, G. Custom chemicals markers stress chiral technologies. *Plant Engineering Magazine*, 2002

HAAK, H. R.; HERMANS, J; VAN DE VELDE, C. J. H. *et al.* Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patientes. *Br J Cancer*, v. 69, n. 5, p. 947-951, 1994.

HAGINAKA, J. Pharmaceuticals and biomedical application of enantioseparation using liquid chromatographic techniques. *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analyses*, v. 27, p. 357-372, 2002.

HAMILTON R.J.; SEWELL P. A. Introduction to high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, New York, 1977. 183 p.

HAROUN, M.; RAVELET, C.; RAVEL, A.; GROSSET, C.; VILLET, A.; PEYRIN, E. Thermodynamic origin of the chiral recognition of tryptophan on teicoplanin and teicoplanin aglycone stationary phases. *J. Sep. Sci.*, v. 28, p. 409-420, 2005.

HEILMANN P. W.; WAGNER, P.; NAWROTH, P. P. *et al.* Therapie des Nebennierenrindenzinoms mit Lysodren (o,p'DDD): Erfahrungen mit der Therapiesteuerung durch Monitoring der Serumspiegel von o,p'DDD. *Medizinische Klinik*, v. 96, n. 7, p. 371-7, 2001.

HOFFMAN, R. The same and not the same, Columbia University Press, New York, 1997

HUTCHISON, T. A.; SHAHAN, D. R. DRUGDEX System. Electronic version. MICROMEDEX, Colorado, Inc.Greenwood Village, v. 120, 2004.

JACOBSON, J. M.; JOHN, H. F.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 43-50, 1987.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em: Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, São Paulo, 2006, cap. IX, p. 273-398.

ILIAS, I.; ALEVIZAKI, M.; PHILIPPOU, G. *et al.* Sustained remission of metastatic adrenal carcinoma during long-term administration of low-dose mitotane. *J Endocrinol Invest*, n. 24, p. 523-535, 2001.

SILVA JR., I. J. Separação cromatográfica dos enantiômeros do anestésico bupivacaína e prejeito de condições de operação em leito móvel simulado. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

JUZA, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 108-118, 2000.

KAGAN, M. Z. Normal-phase high performance liquid chromatographic separations using ethoxynonafluorobutane as hezane alternative I. Analytical and chiral application. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 293-302, 2001.

KANG, G. W.; KO, J. H.; CHEONG, W. J. Thermodynamic study of enantioseparation of arylpropionic acids with the chirex 3001 stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 4, p. 595-610, 2004

KASPERLIK-ZALUSKA, A. A. Clinical Results of the Use of Mitotane for Adrenocortical Carcinoma. *Braz J Med Biol Res*, v. 33, p. 1191-1196, 2000.

KOPF, D.; GORETZKI, P. E.; HENDRIK, L. Clinical Management of malignant adrenal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, n. 127, p. 143-455, 2001.

KÜSTERS, E.; SPÖNDLIN, C. Influence of temperature on the enantioseparation of rolipram and structurally related racemates on Chiracel-OD. *Journal of Chromatography A*, v. 737, p. 333-337, 1996.

LAI, S. M.; LIN, Z. C. Measurement of adsorption characteristics of enantiomers on chiral columns: comparison of the frontal and elution chromatography techniques. *Separation Science and Technology*, v. 34, n. 16, p. 3173-3196, 1999.

LISEC, O.; HUGO, P.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Frontal analyses method to determine competitive adsorption isotherms. *Journal of Chromatography A*, v 908, p. 19-34, 2001.

LIM, M. C.; TAN, Y. O.; CHONG, P. Y. *et al.* Treatment of adrenal carcinoma with mitotane: outcome and complications. *Ann Acad Med Singapore*, v. 19, n. 4, p. 540-544, 1990.

LINDHOLM, J.; FORNSTEDT, T. Investigation of the adsorption behaviour of a chiral model compound on a tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 1095, p. 50-59, 2005.

LÖWENDAHL, A. C.; ALLENMARK, S. G. Liquid chromatography resolution of cyclic sulfoximides and their sulfoxide precursors on an N,N'-dialil-L-tartardiamide-based chiral stationary phase. *Chirality*, v. 9, p. 167-172, 1997.

LUNDEMANN-HOMBOURG, O.; PIGORINI, G.; NICOUD, R. M.; ROSS, D. S.; TERFLOTH, G. Application of the Varicol process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate, v. 947, 59-68, 2002.

MACHEREY-NAGEL; Guia para colunas cromatográficas, p. 62-66, 2000.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*, v. 906, p. 3-33, 2001.

MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. *Journal of Chromatographic A*, v. 769, p. 3-24, 1997a.

MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Supercritical fluid simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatographic A*, v. 786, p. 309-320, 1997b.

MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatographic separation through simulated moving beds under linear and nonlinear conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 827, p. 161-173, 1998.

MEYER, V. R. *Practical high performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons, 1996. 376 p.

MICHEL, M.; EPPING, A.; JUPKE, A. Modeling and determination of model parameters in: *Preparative chromatography of fine and pharmaceuticals agents*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, cap. 6, p. 215-307.

MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SIEDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Träger's base

enantiomers on a amylose-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 955, p. 35-52, 2002.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Kinetic Study of the mass transfer of S-Tröger's base in the system cellulose triacetate and ethanol. *Journal of Chromatography A*, v. 849, p. 445-465, 1999.

MOOLENAR, A.J.; SLOOTEN, H.; VAN SETERS, A. P. *et al.* Blood levels of o,p'DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 7, n. 1, p. 51-54, 1981.

MORIN, N.; GUILLAUME, Y. C.; PEYRIN, E.; ROULAND, J. C. Retention mechanism study of imidazole derivatives on a β -cyclodextrin-bonded stationary phase. Thermal analyses contributions. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 2819-2826, 1998.

POMMIER, R. F.; BRENNAN, M. F. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery*, v. 6, n. 112, p. 963-71, 1992.

REIF, V.D.; SINSHEIMER, J E.; WARD, J.C. *et al.* Aromatic hydroxylation and alkyl oxidation in metabolism of mitotane (o,p'DDD) in humans. *J Pharm Sciences*, v. 63, n. 11, p. 1730-1736, 1974.

REKOSKE, J. A. Chiral Separation. *American Institute for Chemical Engineers Journal*, v. 47, n. 1, p. 2-5, 2001.

RIBEIRO, R. C.; MICHALKIEWICZ, E. L.; FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Adrenocortical tumors in children. *Braz J Med Biol Res*, v. 33, n. 10, p. 1225-34, 2000.

RODRIGUES, A. E.; PAIS, L. S. Design of SMB chiral separation using the concept of separation volume, *Separation Science and Technology*, v. 39, 245-270, 2004.

ROJKOVIČOVÁ, T.; LEHOTAY, J.; KRUPCIK, J.; FEDURCOVÁ, A.; CIZMARIK, J.; ARMOSTRONG, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivates on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 11, p. 1653-1670, 2004.

RUTHVEN, D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Process. New York: John Wiley & Sons, 1984. 433 p.

ROSA, P. C. P. Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

SARTOR, J. P. Separação cromatográfica do fármaco rolipram utilizando fase estacionária O,O'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

SCHLAUCH, M.; FRAHM, A. W. A thermodynamic study of the temperature dependent elution order of cyclic α -amino acid enantiomers on a copper(II)-D-penicillamine chiral stationary phase. Anal. Chem., v. 73, n. 2, p. 262-266, 2001.

SCHTEINGART, D.E.; TSAO, H. S.; TAYLOR, C.I. Sustained remission of Cushing's disease with mitotane and pituitary irradiation. Ann Intern Med, n. 92, p 613-619, 1980.

SCHTEINGART, D.E. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. Braz J Med Biol Res, v. 10, n. 33, p. 1197-1200, 2000.

SCHULICK, R. D.; BRENNAN, M. F. Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. Ann Surg Oncol, n. 6, v. 8, p. 719-726, 1999.

SCHULTE, M.; EPPING, A. Fundamentals and general terminology in: Preparative chromatography of fine and pharmaceuticals agents. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, cap. 2, p. 9-49.

SCHULTE, M.; STRUBE, J.; Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography, Journal of Chromatography A, v. 906, 399-416, 2001.

SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. Journal of Chromatography A, v. 1037, p. 255-272, 2004.

SUFANG, S.; GENGLIANG, Y.; DEXIAN, W.; HANWEN, S. A simple method to determine competitive isotherms-the frontal velocity analyses method. *Chemistry and Environmental Science*, v. 3, n. 8, p. 1-7, 2001.

SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analyses method. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 13-23, 2001.

SUSANTO, A.; WEKENBORG, K.; EPPING, A.; JUPKE, A. Model based design and optimization in: Preparative chromatography of fine and pharmaceuticals agents. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, cap. 7, p. 313-366.

TERZOLO, M; PIA, A.; BERRUTI, A. *et al.* Low-Dose Monitored Mitotane Treatment Achieves the Therapeutic Range With Managable Side Effects in Patients with Adrenocortical Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, n. 6, p. 2234-2238, 2000.

VAN SLOOTEN, H.; MOOLENAR, A. J; VAN SETERS, A. P. *et al.* The Treatment of Adrenocortical Carcinoma with o,p'DDD: Prognostic Implications of Serum Level Monitoring. *Eur J Clin Oncol*, v. 20, n. 1, p. 47-53, 1984.

VASSILOPOULOU-SELLIN, R.; GUINEE, V.F.; KLEIN, M.J. *et al.* Impact of Adjuvant Mitotane on the Clinical Course of Patients with Adrenocortical Cancer. *Cancer*, v. 15, n. 71, p. 3119-23, 1993.

VASSILOPOULOU-SELLIN R., SCHULTZ P.N. Adrenocortical carcinoma: Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer*, v. 92, n. 5, p. 1113-1121, 2001.

WANG, X.; CHING, C. B. Kinetic and equilibrium study of the separation of three chiral center drug, nadolol, by HPLC on a novel perphenyl carbamoylated β -cyclodextrin bonded chiral stationary phase. *Separation Science Technology*, v. 37, n. 11, p. 2567-2586, 2002.

WANG, P.; JIANG, S.; LUI, D.; JIA, G.; WANG, Q.; WANG, P.; ZHOU, Z. Effect of alcohols and temperature on the direct chiral resolution of fipronil, isocarbofos and carfentrazone-ethyl. *Biomedical Chromatography*, v. 19, p. 454-458, 2005.

WENG, W.; WANG, Q. H.; YAO, B. X.; ZENG, Q. L. Enantioseparation of amino acid derivatives on an immobilized network polymer derived from L-tartaric acid. *Journal of Chromatography A*, v. 1042, p. 81-87, 2004.

WENG, W.; ZENG, Q.; YAO, B.; WANG, Q.; LI, S.; Influence of mobile phase composition on the apparent thermodynamic characteristics in liquid chromatographic enantioseparation on tartardiamide-based stationary phase. *Chomatographia*, v. 61, p. 561-566, 2005.

WEWERS, W.; DINGENEN, J.; SCHULTE, M.; KINKEL, J. Selection of chromatographic systems in: *Preparative chromatography of fine and pharmaceuticals agents*. Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co. KGaA, 2005, cap. 4, p. 107-168.

WOOTEN, M. D.; KING, D. K. Adrenal cortical carcinoma. *Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature*. *Cancer*, v. 72, n. 11, p. 3145-55, 1993.

ZENONI, G.; QUATTRINI, F.; MAZZOTI, M.; FUGANTI, C.; MORBIDELLI, M. Scale-up of analytical chromatography to the simulated moving bed separation of the enantiomers of the flavour norterpenoids α -ionone and α -damascone. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, 195-202, 2002.

ZHANG, Z.; MAZZOTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatography processes with a small number of columns: comparison of simulated moving bed with Varicol, PowerFeed and ModiCon, *Korean Journal of Chemical Engineering*, v.21, 454-464, 2004.

ZHOU, D.; KACZMARSKI, K.; GUIOCHON, G. Comparison of the binary equilibrium isotherms of the 1-indanol enantiomers on three high-performance liquid chromatography columns of different sizes. *Journal of Chromatography A*, v. 1015, p. 73-87, 2003.