

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO *o,P'*-DICLORODIFENILDICLOROETANO
(MITOTANO) EM FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL TRIS-3-CLORO-4-
METILFENILCARBAMATO DE CELULOSE E TRIS-3,5
DIMETILFENILCARBAMATO DE AMILOSE**

Autor: Absolon Carvalho da Silva Junior

Orientador: 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
Novembro de 2010

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

Si38s Silva Junior, Absolon Carvalho da
Separação cromatográfica do O,P' -
dichlorodifenildicloroetano (mitotano) em fase
estacionária quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de
celulose e tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose /
Absolon Carvalho da Silva Junior. --Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

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

I. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2,
Quiralidade. 3. Enantiômeros. 4. Adsorção. 5. Massa -
Transferência. I. Santana, Cesar Costapinto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Chromatographic separation of the O,P'-
dichlorodiphenyldichloethane (mitotane) using chiral stationary phase
cellulose tri-3chloro-4-metyl-dimethylphenylcarbamate and amylose
tris-3, 5 dimethylphenylcarbamate

Palavras-chave em Inglês: Chromatography high performance liquid, Chirality,
Enantiomers, Adsorption, Mass - Transfer

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Brás Heleno de Oliveira, Carlos Roque Duarte Correia

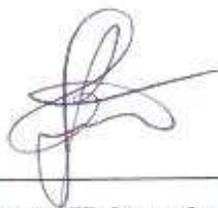
Data da defesa: 12/11/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Absolon Carvalho da Silva Junior e aprovada em 12 de novembro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (Orientador)



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira



Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia

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


Orientador

Dedico

Aos meus filhos, Absolon Neto e Julianne,
razões da minha vida.

AGRADECIMENTO

Apesar de ser um momento onde somos mergulhados dentro de um mar de satisfação, a elaboração dos Agradecimentos é uma tarefa fatigante, pois corremos o risco de cometer injustiças de não conseguir expressar minha gratidão a todos que participaram de forma direta ou indiretamente neste trabalho, tentarei me lembrar de cada pessoa que iluminou esta caminhada.

Primeiramente quero agradecer a Deus pela vida, saúde, coragem e perseverança que me deste, pois, estou quase 2200 Km longe de casa sem nenhum familiar por perto.

Agradeço a Adenilza, mãe dos nossos filhos Absolon e Julianne, por ser pai e mãe durante a minha ausência, cuidando de dois adolescentes sozinha, que deixa qualquer um de “cabelo em pé”, não porque eles sejam rebeldes, mas por estarem numa idade de grande transformação e precisam da presença dos pais para conduzirem na direção do caminho do bem.

Aos meus pais, Absolon e Lúcia, pela educação e carinho depositada na minha personalidade. Muito obrigado, sem o apoio de vocês nada disso teria significado.

Ao prof. Dr. Cesar C. Santana, orientador, que sempre despejou confiança e palavras positivas. Algumas vezes, eu entrava na sua sala desanimado com as dificuldades que estava enfrentando e após alguns minutos de conversa que me deixava ainda mais motivado. Sendo que, eu nunca contava o que estava passando. Muito obrigado professor.

A todos os professores da Faculdade de Engenharia Química, em especial aos professores Antônio Carlos Luz Lisboa e Maria Helena Santana que sempre me incentivaram no aprendizado da língua inglesa. Ele sempre injetando palavras de encorajamento e ela falando: “Absolon tá falatando você passar no Inglês”. Muito obrigado meus queridos professores.

Aos professores Carlos Roque do Instituto de Química e Brás Heleno da Universidade Federal do Paraná, por ter aceito o meu convite para participar da minha banca examinadora.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial a Rosa e ao Gilson, que nunca poupavam esforços quando eu precisava da ajuda deles, o meu sincero agradecimento.

Ao meu amigo Rafael que dedicou algumas horas do seu tempo para ajudar na edição do meu trabalho.

A minha amiga Anayla que me contagiou com seu humor revigorante e entusiasmo pela vida. Obrigado por me chamar de “*Solon*”.

A minha amiga Luisa que mesmo ocupada se prontificou em ajudar-me na ampliação do meu conhecimento. Além disso, muito obrigado pelo saboroso chá que me oferecia quando eu lhe fazia uma visita.

Ao meus amigos João Paulo Vieira, João Paulo Sator, André, Valter, Túlio, Carla Aiolfi, Nara, Ana Carolina, Rubens e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram como suporte das dificuldades vivenciadas, pois me senti apoiado pela boa amizade retribuída.

Aos meus amigos Paulo Jardel e Manuela, os precursores da minha vinda para Campinas, muito obrigado pelo incentivo.

Aos amigos Wagner e Alex Machado pelos passeios de “*bike*” nos lugares mais lindos da região de Campinas como Souza, Pedreira e Joaquim Egídio.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, mas que porventura não tenham sido mencionados, os meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPq pelos recursos financeiros recebidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.

Goethe (1749-1832)

RESUMO

Alguns dos agentes terapêuticos são formulados e comercializados na forma de misturas racêmicas. O fármaco mitotano (*o*, *p'*- diclorodifenildicloroetano) é um exemplo dessa mistura. Utilizado apenas para o tratamento do carcinoma adrenocortical. A molécula do mitotano apresenta um carbono estereogênico, indicando a presença de dois enantiômeros. Estudos com o plasma de pacientes indicaram que os enantiômeros do mitotano apresentam perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes, motivando a separação dos enantiômeros para estudos pré-clínicos mais aprofundados. A separação cromatográfica dos enantiômeros do mitotano foi realizada, no presente estudo, em uma coluna empacotada com fase estacionária quiral tris 3-cloro-4-metil-dimetilfenilcarbamato de celulose e na tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, comercialmente conhecidas como Lux Cellulose-2 e Chiralpak AD, respectivamente. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 15°C, 25°C, 35°C e 45°C, com volume de injeção 20 µl numa concentração igual a 0,2 mg/ml na coluna Lux Cellulose-2 e 2 mg/mL na coluna Chiralpak AD, e vazões da fase móvel variando de 0,2 a 1,6 mL/min. Os parâmetros cromatográficos foram obtidos pelas seguintes fases móveis: (i) hexano puro, (ii) hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v), e (iii) isopropanol/metanol 60:40% (v/v). Os fatores de retenção e a seletividade para a vazão de 1 mL/min com o uso de hexano puro como fase móvel e coluna Lux Cellulose-2 foram de 5,12; 5,81 e 1,14, respectivamente. Com a mesma vazão e com a adição de 0,1% em volume de etanol em hexano puro, os fatores de retenção foram de 1,30, 1,40, ao passo que o valor de seletividade obtida foi de 1,07. O tempo de retenção para a fase móvel contendo etanol foi de aproximadamente 8 minutos, que representa a metade dos valores obtidos com hexano puro, com um ganho substancial em tempo de processo de separação. Na coluna Chiralpak AD, utilizando-se a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v), os fatores de retenção obtidos foram de 0,41, 1,35, enquanto que o valor de seletividade foi de 3,29. As curvas de Van Deemter foram obtidas nas duas fases estacionárias. As isotermas lineares e não-lineares foram determinadas. Também se realizaram as análises termodinâmicas da separação através das variações de entalpia, entropia e energias livre de Gibbs da adsorção, demonstrando estabilidade satisfatória das colunas.

ABSTRACT

Most therapeutic agents in the form of racemic mixtures are formulated and marketed. The drug mitotane (o, p'-dichlorodiphenyldichloroethane) is an example of this mixture, which is indicated as a single drug for treatment of adrenocortical carcinoma. Its structure has a carbon stereogenic, indicating the presence of two enantiomers. Studies with the plasma of patients indicate that the enantiomers of mitotane have different pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles, motivating the separation of enantiomers for preclinical studies in greater depth. The chromatographic separation of these enantiomers in a packed column with chiral stationary phase cellulose tri-3-chloro-4-methyl-dimethylphenylcarbamate and amylose tris - 3, 5dimethylphenylcarbamate was performed. These species are commercially known as Lux Cellulose-2 and Chiralpak AD respectively. The experiments at temperatures of 15°C, 25°C, 35°C and 45°C, with injection volume of 20µl at a concentration equal to 0.2mg/ml in Lux Cellulose-2 column and 2mg/mL in Chiralpak AD column, and a mobile phase flow rate ranging from 0.2 to 1.6mL/min were performed. The chromatographic parameters with mobile phases: (i) hexane, (ii) hexane/ethanol 99,9/0,1% (v/v) and (iii) isopropanol/methanol 60/40% (v/v) were obtained. The retention factors for the flow rate of 1mL/min using hexane as mobile phase and Lux Cellulose-2 column were 5.12, 5.81 respectively, showing a selectivity of 1.14. With addition of 0.1% of pure ethanol in hexane (v/v), for the same flow rate, the retention factors were 1.30 and 1.40 and selectivity of 1.07. The retention time for the mobile phase containing ethanol was approximately 8 minutes, which represents half of the value obtained with pure hexane, resulting a substantial gain in the time of the separation process. In Chiralpak AD column and a mobile phase of isopropanol/methanol 60/40% (v/v), the retention factors were 0.41, 1.35 with a selectivity of 3.29. The Van Deemter curve in the two stationary phases was obtained. The isotherms linear and nonlinear were determined. Thermodynamic analysis of the separation was performed, through variations of enthalpy, entropy and Gibbs free energy of adsorption, demonstrating through these analysis, one satisfactory stability of the columns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Estrutura de Raio-X do mitotano.	7
Figura 3.2 – Esquema reacional para obtenção do mitotano.	7
Figura 3.3 – Esquema clássico de um sistema de separação cromatográfica.	8
Figura 3.4 – Estruturas de alguns derivados de celulose e amilose como fases estacionárias quirais.	10
Figura 3.5 – Estrutura química e tridimensional das fases estacionárias quirais.	11
Figura 3.6 – Sistema cromatográfico	12
Figura 3.7 – Cromatogramas de separação dos enantiômeros do mitotano com vazões e concentrações idênticas, mas com uma mudança na fase móvel. No cromatograma com linha escura contém hexano com 0,1% de etanol, e no cromatograma com linha vermelha contém 100% de hexano.	14
Figura 3.8 – Variação da altura equivalente a um prato teórico (HETP) com a velocidade superficial da fase móvel (u_0) de acordo com a equação de Van Deemter.	21
Figura 3.9 – Curva de ruptura para uma mistura binária com as indicações dos volumes de retenção e das concentrações nos estágios de uma eluição a uma dada concentração de alimentação.....	22
Figura 4.1 – Estrutura molecular do mitotano.	27
Figura 4.2 – Estrutura química do 1, 3, 5–terc–butil–benzeno (TTBB).	28
Figura 4.3 – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose.....	29
Figura 4.4 – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose.	30
Figura 4.5 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.....	32

Figura 4.6 – Visualização de picos cromatográficos durante o experimento para a obtenção das curvas de sobrecarga.	42
Figura 4.7 – Janela de entrada de dados do software “HELP®” que se refere às medidas dos parâmetros da coluna e a injeção analítica.	43
Figura 4.8 – Janela de entrada e saída dos dados do software HELP®, que se refere às medidas de sobrecarga e os parâmetros da isoterma de adsorção.	44
Figura 4.9 – Curva dos tempos de retenção em função da quantidade injetada sobre condições de sobrecarga, obtida através do software HELP®.	44
Figura 5.1 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base polissacarídeo tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com a fase móvel hexano, numa vazão de 1,0 mL/min e comprimento de onda igual a 270 nm na temperatura de 25 °C....	45
Figura 5.2 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base polissacarídeo tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com a fase móvel hexano + 10% de etanol, numa vazão de 0,2 ml/min e comprimento de onda igual a 270 nm na temperatura de 25 °C.	46
Figura 5.3 – Variação da resolução e fator de retenção em função da % de etanol, medido numa vazão de 0,2 mL/min, comprimento de onda de 270 nm e temperatura de 25 °C.	47
Figura 5.4 – Cromatograma obtido experimentalmente em duas fases móveis diferentes: (linha escura) Hexano + 0,1% de etanol e (linha vermelha) Hexano puro (volume injetado de 20 µL, vazão de 1,00 mL/min e temperatura de 25 °C).	48
Figura 5.5 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base de polissacarídeo tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose com a fase móvel acetonitrila/isopropanol 50:50% (v/v); injeção de 20 µL; concentração de 10 g/L; vazão de 1,0 ml/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C.	49
Figura 5.6 – Variação da resolução em função da concentração de metanol na fase móvel.	50
Figura 5.7 – Espectro de varredura da solução de mitotano racêmico. Concentração de 6 mg/L na fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).	51

Figura 5.8 – Espectro de varredura da solução de mitotano racêmico. Concentração de 6 mg/L na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).....	52
Figura 5.9 – Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano detectado no CD e UV-VIS formado a partir de uma injeção de 200 µL, vazão de 2,0 mL/min e comprimento de onda 270 nm.....	53
Figura 5.10 - Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano, na fase móvel hexano puro, detectado no CD e UV; injeção de 20 µL da solução; concentração de 0,2 g/L; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C.	53
Figura 5.11 - Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano, na fase móvel isopropanol/metanol (60:40%, v/v), detectado no CD e UV; injeção de 20 µL da solução; concentração de 1,04 g/L; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C.	54
Figura 5.12 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros em função da temperatura em diferentes vazões, obtida na fase móvel hexano puro e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 µL; concentração de 0,2 g/L ; e comprimento de onda de 270 nm.	60
Figura 5.13 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros em função da temperatura em diferentes vazões, obtido na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 µL; concentração de 0,2 g/L; e comprimento de onda de 270 nm.....	60
Figura 5.14 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel hexano puro e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 µL da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm. ..	61
Figura 5.15 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 µL; concentração de 0,2 g/L; e comprimento de onda de 270 nm.....	62
Figura 5.16 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a temperatura em diferentes vazões, obtido na fase móvel isopropanol/metanol 60:40 (v/v) e fase estacionária Chiralpak – AD com injeções de 20 µL da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm.	64

Figura 5.17 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel isopropanol/metanol 60:40 (v/v) e fase estacionária Chiralpak – AD com injeções de 20 µL da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm.....	65
Figura 5.18 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) para o enantiômero S-(-)-mitotano. As linhas tracejadas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos <u>(○), (□), (Δ) e (★)</u> representam os dados obtidos experimentalmente.	69
Figura 5.19 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) para o enantiômero R-(+)-mitotano. As linhas tracejadas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos representam os <u>(○), (□), (Δ) e (★)</u> dados obtidos experimentalmente.	69
Figura 5.20 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) para o S-(-)-mitotano. As linhas contínuas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos <u>(○), (□), (Δ) e (★)</u> representam os dados obtidos experimentalmente.	73
Figura 5.21 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) para o R-(+)-mitotano. As linhas contínuas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos <u>(○), (□), (Δ) e (★)</u> representam os dados obtidos experimentalmente.	73
Figura 5.22 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose–2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) em função do inverso da temperatura (em Kelvin); Concentração de mitotano = 0,2 g/mL; Q = 1,00 mL/min. 77	
Figura 5.23 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose–2 com a fase móvel hexano puro em função do inverso da temperatura em Kelvin; Concentração de mitotano = 0,2 g/mL; Q = 1,00 mL/min.....	78
Figura 5.24 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose–2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, Q = 1,00 mL/min.	77

Figura 5.25 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano puro em função do inverso da temperatura em Kelvin, Q = 1,00 mL/min.....	79
Figura 5.26 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, Q = 1,00 mL/min.	81
Figura 5.27 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, Q = 1,00 mL/min.	82
Figura 5.28 – Perfis de eluição de sobrecarga dos enantiômeros do mitotano em diferentes concentrações com injeção de 20 µL da solução; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C	83
Figura 5.29 – Perfis de eluição de sobrecarga dos enantiômeros do mitotano em diferentes concentrações com injeção de 20 µL da solução; vazão de 2,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C.....	85
Figura 5.30 – Isoterma de adsorção do enantiômero S-(-)-mitotano em fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.....	86
Figura 5.31 – Isoterma de adsorção do enantiômero R-(+)-mitotano em fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.....	86
Figura 5.32 – Isoterma de adsorção da mistura racêmica do mitotano em fase estacionária tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Diferenças farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais.....	6
Tabela 5.1 – Variação do fator de retenção, fator de separação e resolução em função da concentração da fase móvel.....	47
Tabela 5.2 – Variação do fator de retenção, fator de separação e resolução em função da concentração da fase móvel.....	50
Tabela 5.3 – Porosidade total da fase estacionária Lux Cellulose – 2 com fase móvel hexano/etanol 99,9:0,01 (v/v) na temperatura de 25 °C.....	55
Tabela 5.4 – Porosidade total da fase estacionária Lux Cellulose – 2 com fase móvel hexano puro na temperatura de 25 °C.....	56
Tabela 5.5 – Parâmetros obtidos experimentalmente para determinar a porosidade total da fase estacionária Chiralpak AD com fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) na temperatura de 25 °C.....	57
Tabela 5.6 – Fatores de retenção (k) e de separação (α) do mitotano em Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano puro em da temperatura.....	59
Tabela 5.7 – Fatores de capacidade (k) e de separação (α) do mitotano em Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em da temperatura	59
Tabela 5.8 – Fatores de retenção (k) e de separação (α) do mitotano em coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função da variação de temperatura.....	63
Tabela 5.9 – Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna Lux Cellulose-2 em diferentes fases móveis: hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).....	66
Tabela 5.10 – Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).	66

Tabela 5.11 – Números de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Lux Cellulose–2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).....	67
Tabela 5.12 – Números de pratos teóricos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano.	68
Tabela 5.13 – Parâmetros da equação de van Deemter obtidos na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em varias temperaturas diferentes	70
Tabela 5.14 – Valores de D_L e k_m obtidos a partir dos coeficientes da curva de van Deemter na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).	71
Tabela 5.15 – Números de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol.	72
Tabela 5.16 – Coeficientes da curva de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em varias temperaturas diferentes	74
Tabela 5.17 – Valores de D_L e k_m obtidos a partir dos coeficientes da curva de van Deemter na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v).	75
Tabela 5.18 – Parâmetros termodinâmicos dos enantiômeros do mitotano sobre a fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com diferentes fases móveis e os coeficientes de correlação da curva de van't Hoff ($\ln k_i$ <i>versus</i> $1/T$).	76
Tabela 5.19 – Parâmetros termodinâmicos e temperatura enantiosseletiva dos enantiômeros do mitotano sobre fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com diferentes fases móveis.	79
Tabela 5.20 – Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).	80
Tabela 5.21 – Coeficientes de correlação da curva de van't Hoff ($\ln k_i$ <i>versus</i> $1/T$) para os enantiômeros do mitotano na coluna Chiralpak AD.	81
Tabela 5.22 – Tempos de retenção a meia altura da frente do pico no estudo da sobrecarga em coluna Lux Cellulose-2.	83

Tabela 5.23 – Tempos de retenção a meia altura da frente do pico no estudo da sobrecarga em uma coluna Chiralpak AD.....	84
Tabela 5.24 – Parâmetros da isoterma obtidos com o software HELP a partir do modelo bi-Langmuir competitiva modificada.	87
Tabela 5.25 – Parâmetros da isoterma obtidos com o software HELP a partir do modelo bi-Langmuir competitiva modificada.	89

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Objetivos.....	3
3.1 - Fármacos Quirais.....	5
3.2 - Mitotano	6
3.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	8
3.3.1 – Fundamentos	8
3.4 - Cromatografia Quiral	9
3.4.1 - Estruturas de polissacarídeos de seletores quirais	10
3.4.2 - Parâmetros cromatográficos	12
3.5 - Isotermas de adsorção	21
3.5.1 - Análise frontal	21
3.6 - Modelos de isotermas de adsorção.....	23
3.6.1 - Modelo Linear	23
3.6.2 - Modelo de Langmuir competitivo	24
3.6.3 - Modelo bi-Langmuir competitivo	24
3.7 - Análise da termodinâmica da adsorção.....	25
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 – Materiais	27
4.1.1 – Mitotano.....	27
4.1.2 – Traçador	28
4.1.3 - Fase estacionária.....	28
4.1.4 - Fase móvel.....	31
4.1.5 - Aparelhagem experimental.....	31
4.2 – Métodos	32
4.2.1 - Seleção da fase móvel.....	32
4.2.2 - Análise de resposta do sistema de detecção	34
4.2.3 - Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica.....	34
4.2.2 – Experimentos com soluções diluídas	35

4.2.2.1 – Determinação da porosidade total do leito.....	35
4.2.2.3 – Determinação da porosidade do leito e da partícula	36
4.2.2.4 – Determinação dos parâmetros cromatográficos	37
4.2.2.5 – Determinação das constantes de Henry.....	37
4.2.2.6 – Determinação do coeficiente de dispersão axial e do parâmetro de transferência de massa.....	38
4.2.2.7 – Determinação dos parâmetros termodinâmicos	39
4.2.3 – Experimentos com soluções concentradas	40
4.2.3.1 – Determinação das curvas de sobrecargas	40
4.2.3.2 – Determinação das isotermas de adsorção.....	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 – Seleção da fase móvel.....	45
5.2 - Análise de resposta do sistema de detecção	51
5.3 - Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica	52
5.4. – Experimentos com soluções diluídas.....	55
5.4.1 - Determinação das porosidades total (ϵ_T), do leito (ϵ) e das partículas (ϵ_P) ..	55
5.4.2 - Determinação dos parâmetros cromatográficos.....	58
5.4.3 - Determinação das constantes de Henry	65
5.4.4 - Determinação do coeficiente de dispersão axial e do parâmetro de transferência de massa	67
5.4.5 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	75
5.5 – Experimentos com soluções concentradas	82
5.5.1 – Determinação das curvas de sobrecargas.....	82
5.5.2 - Determinação da isoterma de adsorção	85
6 - CONCLUSÕES	90
6.1 – Sugestões de trabalhos futuros	91
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

NOMENCLATURA

A	Coefficiente da equação de van Deemter
b_i	Constante de associação do componente i (i=1,2...n) (L/g)
$b_{i,ns}$	Constante de associação para os sítios não seletivos (L/g)
$b_{i,s}$	Constante de associação para os sítios enantiosseletivos (L/g)
B	Coefficiente da equação de van Deemter
c_i	Concentração do componente i na fase líquida (i=1,2...n) (g/L)
$c_{i,a}$	Concentração do componente i na alimentação da coluna (g/L)
$c_{i,b}$	Concentração do componente i na segunda frente de adsorção (g/L)
$c_{i,pi}$	Concentração do soluto i no platô intermediário (g/L)
C	Coefficiente da equação de van Deemter
d_p	Diâmetro das partículas (μm)
D_L	Coefficiente de dispersão axial
D_m	Difusividade molecular (cm^2s^{-1})
D_p	Coefficiente de Difusão nos poros (cm^2s^{-1})
HETP	Altura equivalente a um prato (cm)
H_i	Constante de Henry
k_i	Fator de retenção para um componente i (i=1,2.....n)
k_m	Coefficiente de transferência de massa global (min-1)
K	Constante de equilíbrio de adsorção
L	Comprimento da coluna (cm)
N	Número de amostra
N_e	número de moléculas do soluto na fase estacionária
N_m	número de moléculas do soluto na fase móvel
N	Número de pratos
q_i	Concentração do soluto i na fase estacionária (i=1,2.....n) (g/L)
q_s	Capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos
q_s^*	capacidade de saturação da monocamada do adsorvente
q_{ns}	Capacidade de saturação dos sítios não seletivos

Q	Vazão de fase móvel (mL/min)
R	Constante dos gases ideais ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
R^2	Coefficiente de correlação
R_s	Resolução do sistema
t_{calc}	T de student calculado
t_{tab}	T de student tabelado
t_{inerte}	tempo de retenção do inerte (min)
$t'_{R,i}$	tempo de retenção do componente i ajustado ($i=1,2,\dots,n$) (min)
t_M	Tempo das moléculas da fase móvel percorrerem a coluna (min)
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do componente i ($i=1,2,\dots,n$) (min)
τ_e	Tempo necessário para alcançar um equilíbrio
t_0	Tempo de retenção do composto não retido à fase estacionária (min)
$t_{\text{inerte corrigido}}$	Tempo de retenção do inerte corrigido (min)
T	Temperatura (K)
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade (K)
U	Velocidade intersticial da fase móvel (cm/s)
u_0	Velocidade superficial da fase móvel (cm/s)
V_{ads}	Volume de adsorvente (mL)
V_0	Volume de retenção do composto não retido à fase estacionária (mL)
V_C	Volume da coluna (mL)
V_T	Volume de total do sistema cromatográfico (mL)
V_M	Volume morto extracoluna (mL)
V_1	Volume de retenção da primeira frente de adsorção (mL)
V_{1+2}	Volume de retenção da segunda frente de adsorção (mL)
$w_{h,i}$	Largura do pico a meia altura do componente i ($i=1,2$) (min)
Z	Comprimento longitudinal da coluna (cm)
\bar{x}	Média amostral
ΔG^0	Energia livre de Gibbs (kJ/mol)
ΔH^0	Entalpia de adsorção (kJ/mol)
ΔS^0	Entalpia de adsorção (J/mol.K)
$\Delta(\Delta G^0)$	Varição da energia livre de Gibbs (kJ/mol)

$\Delta(\Delta H^0)$	Varição da entalpia de adsorção (kJ/mol)
$\Delta(\Delta S^0)$	Varição da entropia de adsorção (J/mol.K)

SÍMBOLOS GREGOS

A	Fator de separação
E	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
μ	Média do valor teórico
μ_1	Primeiro momento (min)
$\bar{\mu}_2$	Segundo momento (min)
μ_n	n-ésimo momento central
γ_1	Parâmetro geométrico da equação da dispersão axial
γ_2	Parâmetro geométrico da equação da dispersão axial
Φ	Razão entre o volume de fase estacionária pelo volume de fase móvel
Σ	Desvio padrão
σ^2	Variância

ABREVIATURAS

DC	Dicroísmo circular
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
FE	Fase estacionária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
UV-VIS	Ultravioleta-visível
CAC	carcinoma adrenocortical
TAC	tumores adrenocorticais
DDT	<i>Dicloro-Difenil-Tricloroetano</i>

1 - INTRODUÇÃO

Por razões econômicas e dificuldades de ordem prática nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas é comercializada como racemato, ou seja, mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros (MCCONATHY; OWENS, 2003). Atualmente as indústrias farmacêuticas têm mostrado grande interesse na separação dos enantiômeros, na sua forma opticamente pura, não só pelo fato dos enantiômeros puros apresentarem atividades farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes, mas também pelo fato das indústrias farmacêuticas visarem a extensão da proteção das patentes existentes que, proporcionam um aumento nas vendas. Um exemplo refere-se a empresa AstraZeneca que, em 1995 lançou no mercado norte americano um medicamento antiúlcera, comercializado na forma de racemato conhecido pelo nome de Omeprazol, onde a atividade farmacológica reside no enantiômero S. De acordo com a AstraZeneca, uma nova patente foi aprovada para a comercialização do isômero S, em meados de 2000, dentro da Europa e estava aguardando a liberação do comércio dos Estados Unidos, enquanto a patente do racemato findou no ano 2002. Com a quebra da patente do racemato a AstraZeneca perdeu uma parte do mercado para os genéricos do Omeprazol devido a redução dos preços por parte das companhias concorrentes. Segundo estimativa da DiCicco a recuperação das vendas pode ser esperada através da entrada do enantiômero opticamente puro no comércio do seu precessor Omeprazol (STINSON, 2000).

Portanto, por esta razão e ainda o mais importante dos motivos, que é, a obtenção dos enantiômeros do mitotano puros para auxiliar nos estudos das atividades farmacológica e farmacocinética.

O mitotano é um fármaco usado no tratamento do carcinoma adrenocortical (CAC), que trata-se de uma enfermidade rara. Esses tumores podem ser avaliados de comportamento maligno na maioria dos casos. Em contraposição, os tumores adrenocorticais (TAC) malignos são mais raros, agressivos e com prognóstico desfavorável. Nos Estados Unidos estima-se um número entre 1 a 2 casos de TAC por ano para cada 1 milhão de habitantes, que corresponde 0,2% dos casos de cânceres relatados no país (PHAN, 2007). Todavia, um elevado crescimento dos TAC tem afetado crianças e adultos na região sul e sudeste do Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Devido à heterogeneidade e raridade dessa doença, tem sido difícil estabelecer uma predição dos cursos, principalmente para crianças. Nestes casos, um tratamento quimioterápico indicado é o uso do mitotano, que apresenta uma posição de destaque no combate desta doença (SCHTEINGART, 2000). O mitotano é o único agente específico disponível para o tratamento do CAC em estado avançado. Mitotano exerce um determinado efeito citotóxico em células adrenocorticais produzindo degeneração focal do fascicular e, particularmente, a zona reticular, enquanto que as alterações da zona dos glomérulos são relativamente reduzidas (ALLOLIO; FASSNACHT, 2006). Segundo, a prescrição do fabricante o tratamento deve iniciar com pequenas doses diárias de 2 a 6 g divididas em 3 a 4 doses de mitotano por dia. Aumentar gradualmente as doses até 9 a 10 g por dia. Os relatos da literatura indicam claramente que o mitotano exerce sua ação anti-tumoral em concentrações plasmáticas entre 14 e 20 $\mu\text{g/L}^{-1}$.

O mitotano é comercializado na forma racêmica, ou seja, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R e S. Como ocorre com outros fármacos da mesma natureza, é possível a existência de diferenças farmacológicas entre os enantiômeros. A influência da quiralidade da molécula sobre seu efeito farmacológico ainda não foi estudada. Os pacientes que utilizam o mitotano como tratamento, apresentam reações adversas que podem ter alguma relação com a quiralidade da molécula. Portanto, a separação dos enantiômeros é importante para testes biológicos comparativos de efeitos colaterais. O método mais adequado na separação das misturas enantioméricas é a cromatografia quiral.

A separação preparativa de enantiômeros por cromatografia em fase estacionária quiral foi reconhecida como sendo uma alternativa útil mais abordada em relação às convencionais, como a síntese enantiosseletiva e as transformações enzimaticamente catalisadas (FRANCOTTE, 2001). Segundo FRANCOTTE (1994), pelo menos durante a fase de testes preliminares de novos fármacos quirais, a técnica de cromatografia permite acesso rápido aos enantiômeros puros ou enriquecidos e podem substituir com vantagens a elaboração freqüentemente prolongada de uma síntese enantiosseletiva.

A primeira técnica que obteve maior aceitação na produção de pequenas quantidades de substâncias quirais, foi a cromatografia líquida preparativa de alta eficiência; logo após o surgimento das fases estacionárias que reconheciam os enantiômeros. Além disso, a combinação apropriada entre a fase estacionária e a fase móvel escolhida, permite que a mistura enantiomérica elua através da coluna em tempos distintos (REKOSKE, 2001).

A cromatografia líquida preparativa cada vez mais torna-se um importante processo de separação para isolamento e purificação de produtos farmacêuticos e biomoleculares. Contudo, as técnicas cromatográficas possuem alto custo e em uma escala industrial requer uma cuidadosa otimização das condições de operação com respeito às taxas de produção, recuperação e custo de separação (MORGENSTERN, 2004).

A maioria das moléculas presente na natureza se encontra na forma enantiomericamente pura. Assim, moléculas que contém um átomo tetraédrico e que apresentam quatro grupos diferentes ligados, podem ser encontradas em duas formas enantioméricas, as quais apresentam propriedades físico-química idênticas. Quimicamente, eles demonstram comportamento diferentes somente em ambientes quirais. Pode-se afirmar que o mesmo fato aconteça com o mitotano.

Hoje, não existe nenhum estudo relacionado ao efeito de cada enantiômero do mitotano opticamente puro *in vivo*. Há, apenas, alguns estudos que relatam a presença desses enantiômeros com diferentes atividades dentro do plasma sanguíneo e nos tecidos adiposos de seres humanos e porquinhos da Índia após o uso da mistura racêmica deste fármaco (RIBEIRO *et al.*, 2002; CANTILLANA *et al.*, 2009).

Portanto, o desenvolvimento de processos em escala preparativa para separação dos enantiômeros do mitotano é de suma importância na investigação dos efeitos toxicológicos deste enantiômero, durante a sua utilização como protagonista no tratamento dos TAC.

1.1 – Objetivos

O objetivo desse trabalho foi estudar a separação enantiomérica do agente antineoplástico o, p'-diclorodifenildicloetano (mitotano) em duas fases estacionárias quirais baseados nos polissacarídeos celulose e amilose como descrito a seguir: (i) tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose e, (ii) tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose comercialmente conhecidas como Lux Cellulose-2 e Chiralpak AD, respectivamente.

Por sua vez, para alcançar o objetivo do trabalho foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção de uma fase móvel otimizada para separação cromatográfica dos enantiômeros do mitotano nas diferentes fases estacionárias, a partir da combinação dos solventes em diferentes composições;
- Avaliação do comprimento de onda adequado para o sistema de detecção;
- Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros e seus parâmetros de separação cromatográfica;
- Determinação dos parâmetros de transferência de massa da separação cromatográfica a partir da obtenção do gráfico de van Deemter;
- Obtenção e avaliação dos parâmetros termodinâmicos de separação;
- Determinação das porosidades totais nas diferentes fases estacionárias para obtenção dos coeficientes de Henry;
- Avaliação do perfil de sobrecarga da coluna com diferentes massas inseridas no leito empacotado;
- Obtenção das isotermas de adsorção.

Esse conjunto de resultados permite compor um dossiê de dados necessários para a separação cromatográfica preparativa do mitotano, visando à utilização dos enantiômeros enriquecidos em testes pré-clínicos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Fármacos Quirais

O conhecimento sobre a existência e as diferenças entre enantiômeros datam de mais de um século. A partir da tragédia com a talidomida, na década de 60, que o mundo voltou-se para a importância dos estudos e do controle de fármacos enantioméricos (ORLANDO *et al.*, 2007). Estudos revelaram que, o enantiômero (-)-(S) da talidomita apresenta um forte efeito teratogênico (causa deformidades físicas em recém nascidos). Infelizmente, estudos posteriores constataram a inversão de configuração não apenas *in vitro* mas, também, *in vivo* (ERIKSSON *et al.*, 2001; ERIKSSON *et al.*, 1995), ou seja, a administração do enantiômero (+)-(R)- puro, pode ser parcialmente convertido no isômero responsável pelo efeito teratogênico. Exemplos menos drásticos que esse é bastante comum, nos quais as diferenças existentes entre os dois enantiômeros podem ser qualitativas ou quantitativas, sendo que, nesse último caso, o enantiômero mais ativo é chamado de eutômero enquanto que ao outro se dá o nome de distômero (ELIEL, 1997). Estudos têm mostrado que β -bloqueadores, como o propranolol, se ligam estereosseletivamente a receptores β -adrenérgicos e que os enantiômeros (-)- são os principais responsáveis pela atividade β -bloqueadora dessa classe de fármacos (MEHVAR; BROCKS, 2001).

Apesar da inovação das técnicas de separação dos enantiômeros de fármacos quirais, as drogas, antes de serem lançadas no mercado, devem ser amplamente estudadas no âmbito dos seus quadros biológico e toxicológico (ORLANDO *et al.*, 2007). A Tabela 3.1 mostra a distinção das atividades farmacodinâmicas de cada enantiômero.

Tabela 3.1 – Diferenças farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais.

Comparação entre a atividade biológica e a configuração absoluta de substâncias relacionadas enantioméricamente.

Nome da substância	Configuração dextrogira (ou como especificado)	Configuração levogira (ou como especificado)
Talidomida	Sedativo e hipnótico	Extremamente teratogênico
Verapamil	Ação antitumoral	Ação antiarrítmica
Cloranfenicol	(R, R) Antibacteriano	(S, S) Inativo
Propranolol	Contraceptivo	Anti-hipertensivo antiarrítmico
Etambutol	(R, R) Causa cegueira	(S, S) Tuberculostático
1-Cloro propano-2,3-diol	Tóxico	Atividade anti-fértil

Fonte: Adaptado de FEDERSEL (1993) e CHAN (1993).

3.2 - Mitotano

Há cinquenta anos foi publicado o primeiro trabalho sobre o efeito benéfico do mitotano no tratamento de pacientes com CAC metastático e nos pacientes reincidente, logo após ter sido submetido a um tratamento cirúrgico. O mitotano é subproduto da síntese do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (WAJCHENBERG *et al.*, 2000) e sua nomenclatura é 1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil) etano.

A molécula do mitotano apresenta um carbono estereogênico, devido aos quatro substituintes ligados a um carbono central serem diferentes, indicando uma tendência de seus enantiômeros opticamente puros apresentarem atividades biológicas distintas, quando administrados por seres vivos. A fórmula espacial do mitotano está representada na Figura 3.1.

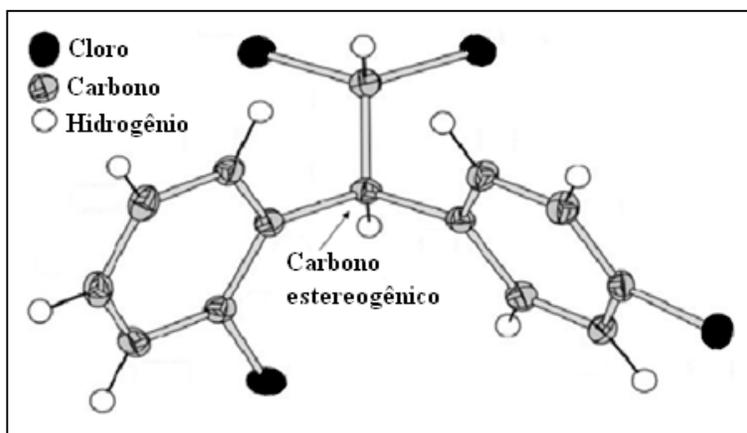


Figura 3.1 – Estrutura de Raios-X do enantiômero S(-)-mitotano. Adaptado de CANTILLANA (2009).

Segundo Buser e Müller (1995), o 1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil) etano apresenta a configuração S(-) e R(+). A configuração S e R está associada à distribuição dos substituintes no carbono assimétrico. Essa notação foi proposta por Cahn, Ingold e Prelog e é conhecida como notação R e S (ALLINGER *et al.*, 1983). No entanto o sinal (+ e -) refere-se ao desvio do plano da luz polarizada de cada enantiômero.

O mitotano é obtido por via sintética, através da reação entre o dicloroacetaldeído mais um reagente de Grignard, que produz o 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil) etanol. O 2,2-dicloro-1-(2-clorofenil) etanol reage com cloro benzeno na presença de ácido sulfúrico, conduzindo assim, a obtenção de uma mistura racêmica de mitotano (Figura 3.2) (VARDANYAN, 2006).

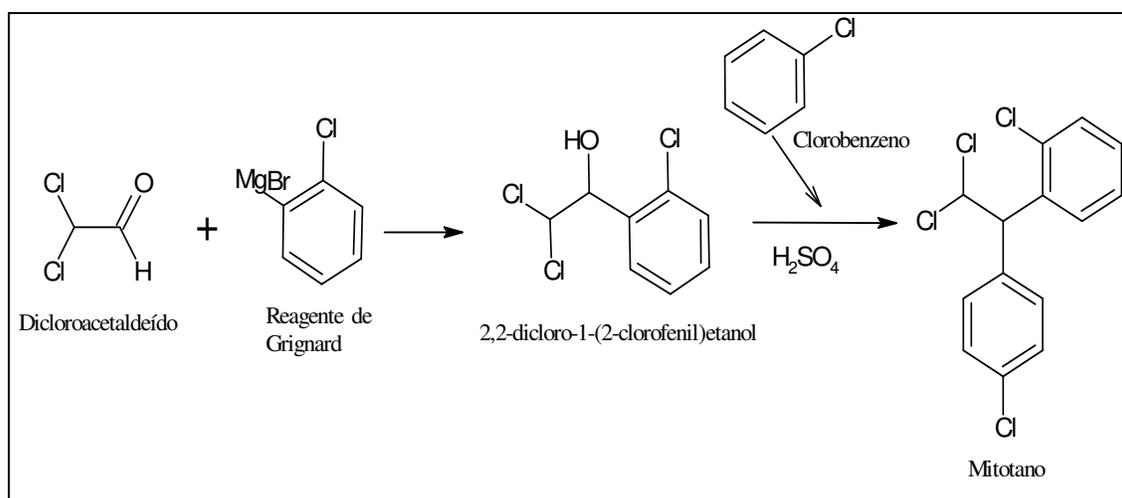


Figura 3.2 – Esquema reacional para obtenção do mitotano. Adaptado de VARDANYAN (2006).

3.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.3.1 – 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. A grande variedade de combinações entre fase móvel e estacionária torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é que esta utiliza fase estacionária composta de micropartículas iguais a, ou menores que, 20 μm de diâmetro. Esta fase estacionária, por ser menos permeável, é necessário a utilização de bombas de alta pressão e precisão para eluir a fase móvel através da coluna (CASS; DEGANI, 2001).

Na CLAE em fase normal (fase estacionária é mais polar que a fase móvel) os solventes polares são denominados fortes e, os apolares são fracos. Com o decréscimo da força do solvente, em relação à fase estacionária, ocorre um aumento na retenção dos componentes de interesse dentro da coluna empacotada. Um esquema clássico da CLAE envolve seis componentes básicos (Figura 3.3).

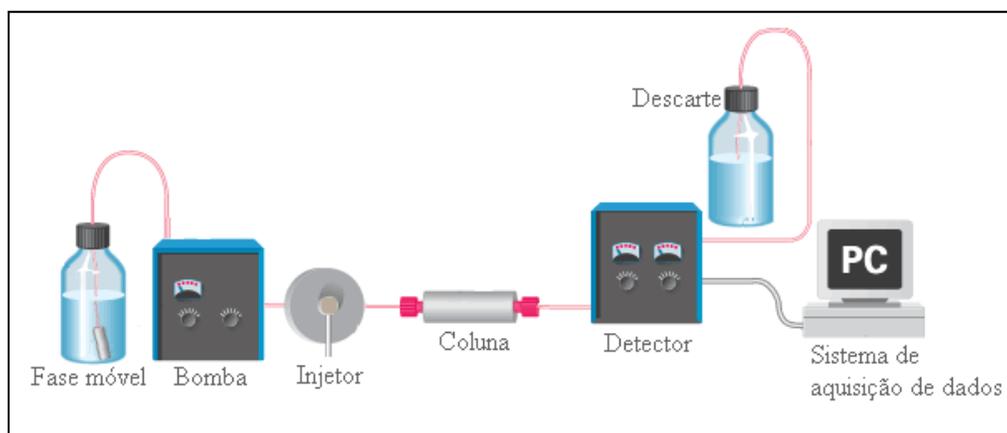


Figura 3.3 – Esquema clássico de um sistema de separação cromatográfica.

3.4 - Cromatografia Quiral

A idéia básica da resolução quiral começou com o desenvolvimento da quiralidade em 1809 por Haiüy, e mais tarde, foi então descoberta, por Pasteur, a diferença da taxa de destruição do tartarato de amônio levógiro e dextrógiro pelo fungo *Penicillium glaucum*. Quiralidade é um termo muito usado na química orgânica, pois confere às moléculas que suas imagens especulares não são sobreponíveis. A quiralidade é encontrada em uma grande variedade de objetos, como por exemplo as nossas mãos são quirais.

A cromatografia mais aplicada na resolução de enantiômeros é a CLAE. Os enantiômeros apresentam propriedades físicas e químicas análogas, a grande maioria não é separada por métodos convencionais, por exemplo, a cristalização. O mecanismo de resolução enantiomérica por cromatografia quiral está consolidado na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto. As interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio, as interações π - π e dipolo-dipolo) e forças de Van Der Waals (efeitos estéreo – forças de atração e repulsão) são interações transitórias. Portanto, os diferentes tempos de retenção está ligado diretamente a diferentes estabilidades transitórias dos complexos formados. Assim aquele enantiômero que eluir primeiro apresenta um complexo diastereoisomérico transitório menos estável (CASS; DEGANI, 2001).

Há dois métodos para resolver os enantiômeros, um método direto e um indireto. No método indireto os enantiômeros primeiro são transformados em diastereoisômero com reagentes quirais opticamente puros, após a reação, eles são separados em fases estacionárias aquirais, tal como a fase estacionária octadecilsilano (C18). Portanto, o método indireto apresenta uma desvantagem com relação ao procedimento direto, o tempo de execução é muito maior. No método direto utiliza-se fase estacionária quiral ou aditivo quiral na fase móvel (SILVA JUNIOR, 2003), geralmente a fase estacionária ou o aditivo quiral são polímeros de polissacarídeos de seletores quirais.

3.4.1 - Estruturas de polissacarídeos de seletores quirais

Quase todos os polissacarídeos são de naturezas quirais e opticamente ativos por causa de suas estruturas assimétricas. A maioria dos polímeros apresentam uma configuração específica ou estrutura de ordem superior decorrentes de sua quiralidade que é essencial para a resolução quiral das misturas racêmicas. A primeira resolução com polissacarídeos foi realizada em 1951 por Kotake e colaboradores, eles conseguiram separar aminoácidos usando a cromatografia de papel (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007).

Existem vários tipos de polímeros naturais que são usados para separar misturas racêmicas, tal como celulose, amilose, quitosana, dextrana e xilano. Atualmente, as mais utilizadas são amilose e celulose, devido os melhores resultados de separações das misturas racêmicas, ocasionadas por sua configuração quiral, serem mais favoráveis à conversão em uma variedade de derivados, como acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamato, garantindo assim, um maior número de sítios para o reconhecimento quiral, a Figura 3.4 ilustra alguns radicais presentes na maioria das fases estacionárias.

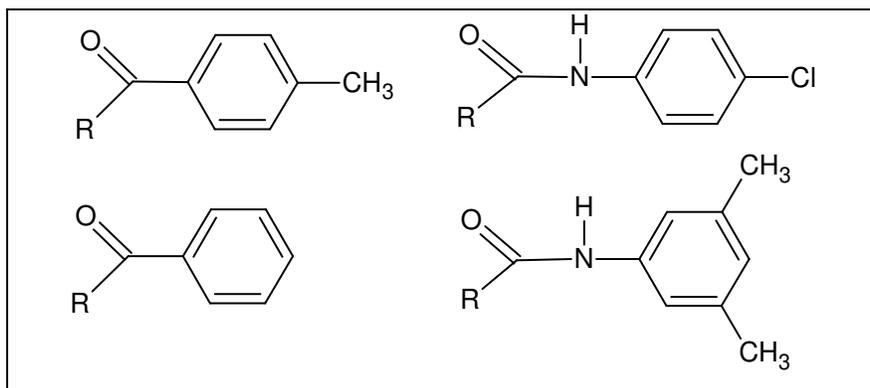


Figura 3.4 – Estruturas de alguns derivados de celulose e amilose como fases estacionárias quirais. R – representa a fase estacionária de celulose ou amilose. (Adaptado de COLLINS et al., 2006).

A cadeia polimérica formada pela amilose e a celulose é de forma helicoidal e linear, respectivamente. Na celulose e amilose, a corrente polimérica é formada por unidades de glicose (D-(+) glicose). A diferença entre as estruturas de celulose e amilose está no tipo de ligação

formada, ou seja, a celulose apresenta, na sua cadeia polimérica, ligações do tipo β -1-4, enquanto que na amilose, a cadeia polimérica é proveniente de ligações α -1-4 (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007). A Figura 3.5 ilustra esta conformação.

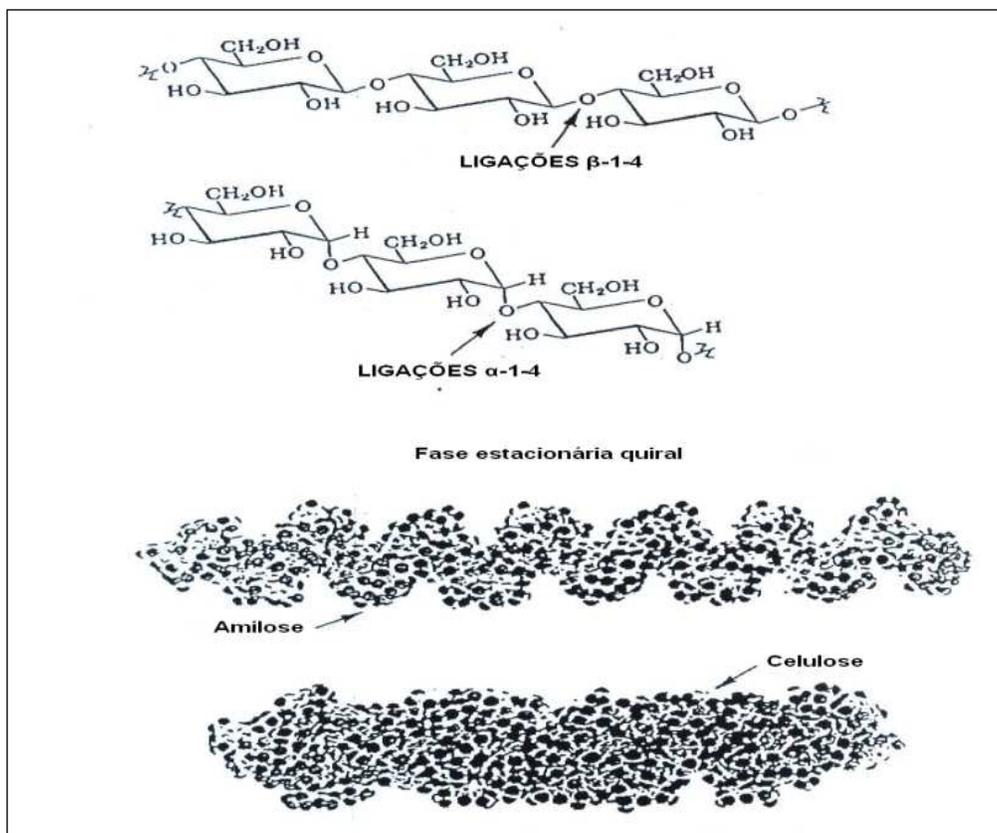


Figura 3.5 – Estrutura química e tridimensional das fases estacionárias quirais (adaptado de ALI; ABOUL-ENEIN, 2007).

Ambos possuem cavidades quirais, que são responsáveis pela resolução quiral. Vale ressaltar que a natureza da amilose é mais helicoidal e possui cavidades bem definidas, tornando-a diferente da correspondente celulose análoga, que parece ser mais de natureza linear e rígida (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007).

As cavidades formadas pela estrutura terciária da amilose e celulose, são capazes de reter moléculas estereosseletivamente (COLLINS, *et al.*, 2006).

3.4.2 - Parâmetros cromatográficos

O tempo de retenção (t_R) engloba todo o tempo do percurso das moléculas do soluto em movimento com a fase móvel a partir do injetor até a sua detecção, ou seja, é a soma dos tempos de permanência das moléculas do soluto na fase estacionária dentro do sistema cromatográfico (Figura 3.4).

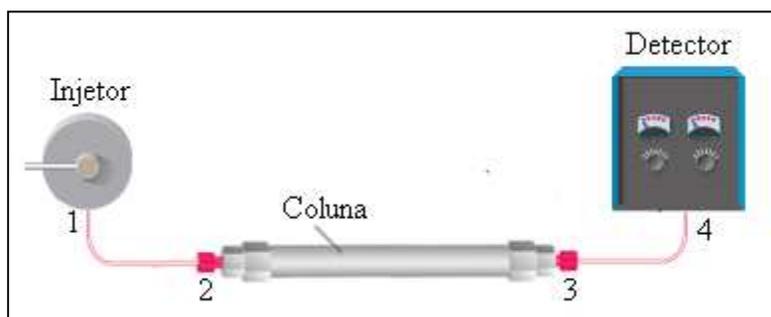


Figura 3.6 – Sistema cromatográfico (t_{12} e t_{34} são os tempos de permanência do soluto fora da coluna e t_{23} é o tempo de retenção do soluto dentro da coluna).

A soma dos três tempos acima citado resulta no tempo de retenção global da molécula dentro do sistema cromatográfico. Sendo assim, o tempo de retenção do componente ajustado é a diferença entre o tempo de retenção e o tempo das moléculas da fase móvel percorrerem a coluna. Este tempo de retenção ajustado é determinado com auxílio de um constituinte que não interage com a fase estacionária. Ele pode ser calculado a partir da Equação 3.1.

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M \quad (3.1)$$

equação na qual, $t'_{R,i}$, $t_{R,i}$ e t_M são tempo de retenção do componente i ajustado, tempo de retenção do componente i e tempo das moléculas da fase móvel percorrerem a coluna, respectivamente.

O fator de retenção é a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária (N_e) e o número de moléculas do soluto na fase móvel (N_m). O fator de retenção pode ser adquirido entre a razão do tempo de retenção do componente i ajustado ($t'_{R,i}$) e o tempo das moléculas da fase móvel percorrerem a coluna (t_M) (CASS; DEGANI, 2001). A partir da Equação 3.2 pode-se calcular o fator de retenção.

$$k_i = \frac{N_e}{N_m} = \frac{t'_{R,i}}{t_M} \quad (3.2)$$

O valor de k tem relação direta com a eficiência e o alargamento dos picos, este valor não pode ser baixo e, tão pouco, alto. Assim, valor de k baixo significa fraca interação dos solutos com a fase estacionária (FE) e para valores elevados possui uma forte interação com a FE. No entanto, a força de interação pode ser também governada pela fase móvel (FM) empregada, ou seja, valor de k baixo indica uma FM muito forte e/ou pouca interação do soluto com a FE, enquanto um k elevado tem indício de uma forte interação com a FE e/ou o eluente é muito fraco (CASS; DEGANI, 2001).

Segundo COLLINS *et al.* (2006), o intervalo ideal de fator de retenção para um componente simples é $1 \leq k \leq 10$; entretanto, para análise de múltiplos componentes, também aceita-se $0,5 \leq k \leq 20$. Portanto, o primeiro parâmetro normalmente ajustado no sistema cromatográfico deve ser o fator de retenção. Para otimização desse fator é aplicado um procedimento empírico por tentativa e erro, para ajustar a força cromatográfica da fase móvel. A Figura 3.7 mostra os diferentes tempos de eluição da mistura racêmica estudada nesta dissertação com duas fases móveis diferentes e na mesma fase estacionária.

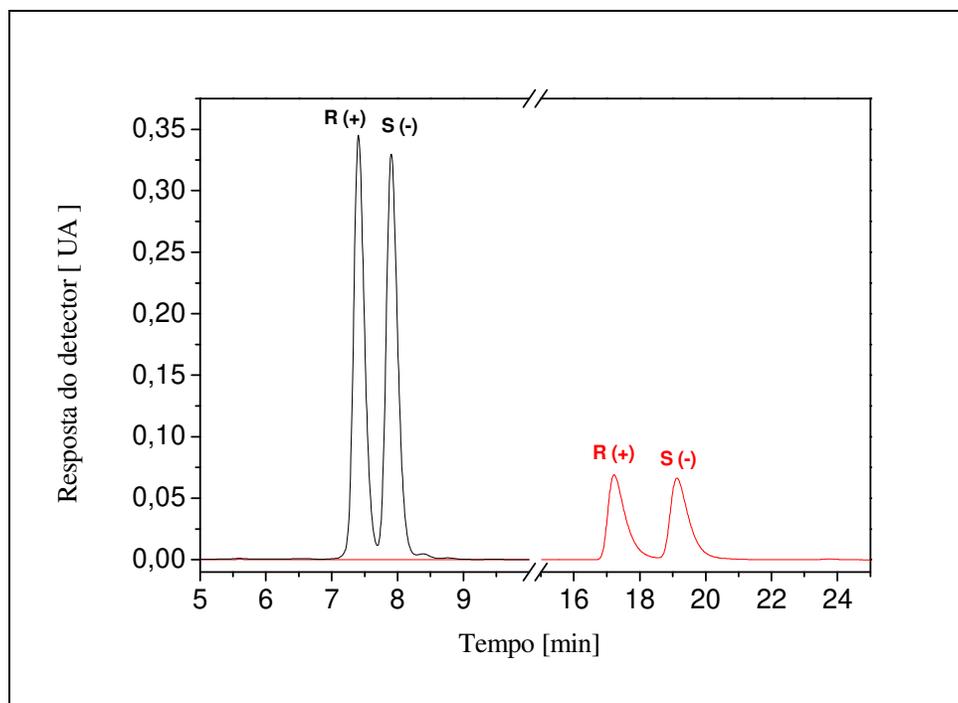


Figura 3.7 – Cromatogramas de separação dos enantiômeros do mitotano com vazões e concentrações idênticas, mas com uma mudança na fase móvel. No cromatograma com linha escura contém hexano com 0,1% de etanol, e no cromatograma com linha vermelha contém 100% de hexano.

Outro termo útil para cromatografia é o fator de separação, esse fator mede a seletividade de separação entre duas bandas adjacentes (CASS; DEGANI, 2001). O fator de separação (α) é a razão entre os fatores de retenção de dois picos adjacentes, que também são relacionados com tempos de retenção ajustados (COLLINS *et al.*, 2006). A Equação 3.3 é utilizada para calcular esse fator.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}} \quad (3.3)$$

A resolução (R_S) é outra medida quantitativa de separação do sistema de cromatografia em coluna. É calculada a partir da distância (tempo de retenção ajustado) entre dois picos

adjacentes dividido pela média das larguras de suas respectivas bases, conforme apresentado na Equação 3.4.

$$R_S = 1,177 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h,1} + w_{h,2}} \quad (3.4)$$

Segundo COLLINS *et al.*, (2006), para valores de $R_S = 1$, os picos são poucos separados, se eles estiverem em proporções iguais dentro de uma mistura binária. Já valores iguais a 1,25 indicam uma melhor separação. No entanto, servem somente para mensurar a quantidade presente na mistura, enquanto R_S maior que 1,5 indica separação completa.

Conforme a farmacopéia americana, só é aceitável uma resolução entre dois picos adjacentes um valor de R_S maior que 2,0 (DANTUS; WELLS, 2004; USP 27, apud ROSA, 2005, p. 33).

O HETP “em inglês *height equivalent to a theoretical plate*” ou altura equivalente a um prato é definido pela razão entre a altura (comprimento) da coluna, L , e o número de pratos, N . A Equação 3.5 representa esta razão (COLLINS *et al.*, 2006).

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (3.5)$$

O número de pratos, N , é considerado como sendo a razão do tempo de retenção, $t_{R,i}$, e o tempo necessário para alcançar um equilíbrio, τ_e , conforme Equação 3.6 (GUIOCHON, 2006).

$$N = \frac{t_{R,i}}{\tau_e} \quad (3.6)$$

O problema é definir e calcular τ_e . Uma estimativa poderia ser derivada da lei de Fick, que afirma que o tempo requerido para atingir equilíbrio entre o centro da esfera e a solução ao redor da esfera é proporcional ao d_p^2/D_m . Combinando a definição empírica da Equação 3.6 e a lei de Fick, resulta na Equação 3.7 (GUIOCHON, 2006).

$$N \propto \frac{D_p}{d_p^2} t_{R,i} \quad (3.7)$$

Onde D_p é o coeficiente de difusão nos poros, o qual inclui as contribuições do coeficiente de difusão na fase móvel impregnada à partícula, o coeficiente de impedimento devido à tortuosidade, a contração da rede dos poros e a difusão superficial. Isto mostra que, para aumentar a eficiência da coluna, é necessário aumentar o tempo de retenção, bem como aumentar o coeficiente de difusão pela melhoria da estrutura da rede dos poros no interior das partículas, aumentar o coeficiente de difusão de massa, no qual é proporcional a D_p e diminuir o tamanho médio das partículas (GUIOCHON, 2006). Apesar de conhecer todos os parâmetros para melhorar a eficiência da coluna cromatográfica, o problema ainda perdura, é preciso encontrar o melhor caminho para projetar e construir um sistema com melhores valores desses parâmetros (GUIOCHON, 2006).

A Equação 3.8 define a eficiência da coluna que é caracterizada pelo espalhamento do pico de um composto durante sua eluição ao longo da coluna:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_{R,i}}{w_{h,i}} \right)^2 \quad (3.8)$$

Por definição dos momentos de uma distribuição, n-ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é calculado pela Equação 3.9 (GUIOCHON, SHIRAZI, KATTI, 1994).

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, z = L)t^n dt \quad (3.9)$$

A Equação 3.10 apresenta o n-ésimo momento absoluto ou normalizado.

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z=L)t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z=L)dt} \quad (3.10)$$

O n-ésimo momento central está representado pela equação 3.11.

$$\bar{\mu}_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z=L)(t-\mu)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z=L)dt} \quad (3.11)$$

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, o qual está, cromatograficamente, relacionado ao espalhamento do pico, causado pela não linearidade das isothermas de adsorção e resistência à transferência de massa (WANG; CHING, 2002).

Para modelo de força linear de filme sólido, a expressão para o primeiro e o segundo momento são representadas pelas Equações 3.12 e 3.13, respectivamente (WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998).

$$\mu_1 = \frac{L}{u_0} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] \quad (3.12)$$

$$\bar{\mu}_2 = \frac{2L}{u_0} \left\{ \frac{D_L}{u_0^2} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^2 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \right\} \quad (3.13)$$

A definição geral de HETP da coluna é dada pela Equação 3.14 (GUIOCHON, 2006):

$$\text{HETP} = \frac{\bar{\mu}_2}{\mu_1^2} L \quad (3.14)$$

Assim HETP é dado pela Equação 3.15:

$$\text{HETP} = \frac{2D_L}{u_0} + 2u_0 \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{k_m K} \left(1 + \frac{\varepsilon}{(1-\varepsilon)K} \right)^{-2} \quad (3.15)$$

esta expressão pode ser reescrita em termo da velocidade superficial da fase móvel (u) (DUAN, CHING, SWARUP, 1998; BÖCKER *et al.*, 2002):

$$\text{HETP} = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^{-2} \quad (3.16)$$

Nas equações apresentadas anteriormente, D_L é o coeficiente de dispersão axial da coluna, k_m , o coeficiente de transferência de massa global. De acordo com GUIOCHON, SHIRAZI E KATTI (1994), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão seja representado pela Equação 3.17.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (3.17)$$

Cada etapa em que a molécula alcança o equilíbrio corresponde a um “estágio de equilíbrio” ou um “prato teórico”. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior a chance de resolução. Uma vantagem do processo cromatográfico é que no interior de uma coluna de comprimento moderado existe um número muito grande de pratos teóricos (SILVA, 2003).

O HETP (Altura Equivalente a um Prato Teórico) para uma coluna cromatográfica pode ser calculado aproximadamente pela equação de Van Deemter, conforme Equação 3.18.

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u_0} + C u_0 \quad (3.18)$$

O primeiro termo da Equação 3.18 descreve o efeito da difusão turbilhonar, que é constante por toda a variação de velocidade. Ele refere-se ao alargamento dos picos devido a diferentes caminhos seguidos pelas moléculas da amostra. O termo A é diretamente proporcional

ao diâmetro da partícula que consiste na altura absoluta do prato. A altura do prato pode então ser diminuída pelo uso de partículas menores (SCHULTE, EPPING, 2005; COLLINS *et al.*, 2006).

O segundo e terceiro refere-se à difusão axial longitudinal e a resistência à transferência de massa respectivamente. Os coeficientes de cada termo da Equação 3.18 são definidos como sendo:

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (3.19)$$

$$B = 2\gamma_1 D_m \quad (3.20)$$

equação na qual, γ_1 e γ_2 são constantes geométricas que possuem valores próximos a 0,7 e 0,5, respectivamente. d_p e D_m são o diâmetro da partícula e o coeficiente de difusão molecular, respectivamente.

$$C = 2 \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^{-2} \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{K}{k_m} \quad (3.21)$$

equação na qual, K , ε e k_m são a constante de equilíbrio, a porosidade do leito e o coeficiente de resistência a transferência de massa, respectivamente.

A figura 5 representa as curvas de cada termo da Equação 3.18.

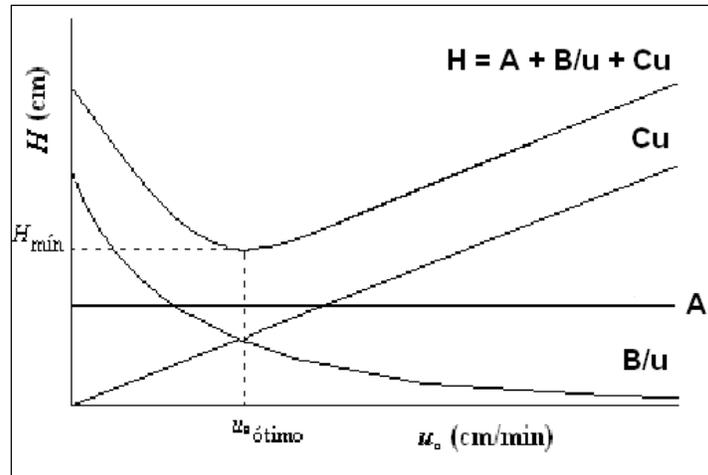


Figura 3.8 – Variação da altura equivalente a um prato teórico (HETP) com a velocidade superficial da fase móvel (u_0) de acordo com a equação de Van Deemter.

3.5 - Isotermas de adsorção

A isoterma de adsorção descreve uma relação entre a concentração do soluto i na fase líquida (c_i) e a concentração de soluto na fase sólida definida (q_i) em temperatura e pressão constantes quando o equilíbrio é alcançado, Equação (3.23). As isotermas de adsorção só podem ser determinadas experimentalmente. Apesar de existir um grande número de métodos experimentais disponíveis, sua apropriada aplicação e eficiência ainda está muito longe de ser uma rotina de trabalho (MORGENSTERN, 2004).

3.5.1 - Análise frontal

É uma variante do método dinâmico na determinação de isotermas, e é a mais usada, pela sua precisão e relativa simplicidade (MIHLBACHLER et al., 2002). No entanto, este método consome uma elevada quantidade de soluto.

A análise frontal é uma ferramenta conveniente para predizer a concentração no platô intermediário e o tempo de retenção das frentes de adsorção. Apenas esses dados precisam ser determinados experimentalmente para resolver o problema. Este conceito é aplicado como uma ferramenta padrão para determinar isothermas para um único soluto, a partir da dependência da concentração com o tempo de retenção na região frontal à curva de ruptura (MORGENSTERN, 2004). Para isothermas multicomponentes, as curvas de ruptura também podem ser usadas, mas com algumas restrições (JACOBSON; FRENZ; HORVÁTH, 1987). A curva de ruptura para uma mistura binária tem duas ondas separadas pelo platô intermediário como apresentado na Figura 3.9.

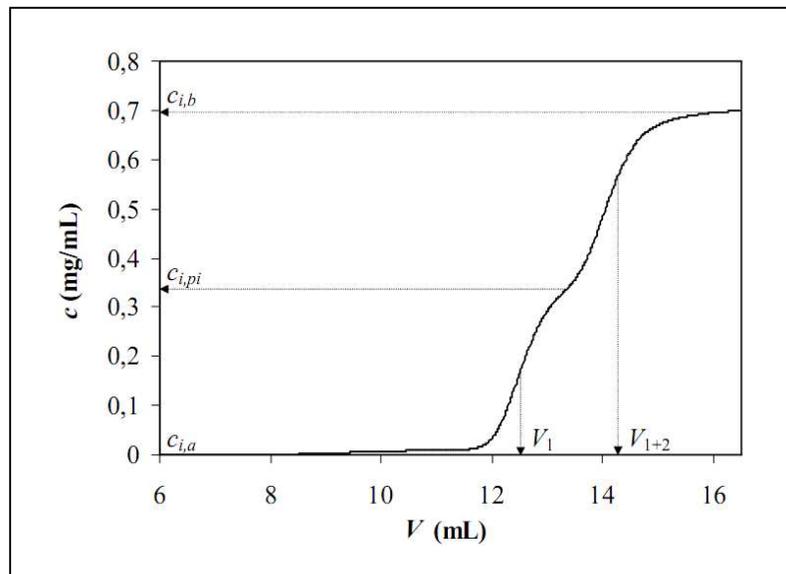


Figura 3.9 – Curva de ruptura para uma mistura binária com as indicações dos volumes de retenção e das concentrações nos estágios de uma eluição a uma dada concentração de alimentação (SARTOR, 2006).

A Equação (3.22) demonstra o balanço de massa envolvido na curva de ruptura da Figura 3.9.

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(C_{i,b} - C_{i,a}) - (V_{1+2} - V_1)(C_{i,pi} - C_{i,a})}{V_{ads}} \quad (3.22)$$

Equação na qual, V_0 , V_1 , V_{1+2} e V_{ads} são o volume morto do sistema, volume de retenção da primeira e da segunda frentes de adsorção e volume de adsorvente presente na coluna, respectivamente. $c_{i,a}$ e $c_{i,b}$ são as concentrações do componente i na alimentação da coluna em equilíbrio inicialmente (anterior a $t = 0$) e atrás da segunda frente de adsorção (platô superior). $c_{i,pi}$ é a concentração do componente i no platô intermediário (SARTOR, 2006).

3.6 - Modelos de isotermas de adsorção

3.6.1 - Modelo Linear

Quando trabalha com soluções diluídas a isoterma linear é descrita da relação da constante de Henry com a concentração dos solutos na fase móvel em equilíbrio com a concentração de soluto na fase estacionária, essa relação é demonstrada na Equação 3.23.

$$q_i = H_i c_i; i = 1, 2, \dots, n \quad (3.23)$$

em que, H_i , q_i e c_i são a constante de Henry para um componente i , concentração do soluto i na fase estacionária e concentração do soluto i na fase móvel respectivamente.

3.6.2 - Modelo de Langmuir competitivo

O modelo mais frequentemente utilizado para descrever adsorção não-linear, é o modelo de Langmuir competitivo, embora seja assumido que é um modelo muito simples para informar a adsorção em fases estacionárias quirais (SATOR, 2006). Segundo James (1994), o processo de adsorção acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio até que a cobertura da monocamada seja alcançada. A Equação 3.24 deduz a relação existente entre os sítios de adsorção máximo e as concentrações nas fases.

$$q_i = q_s^* \frac{b_i c_i}{1 + b_1 c_1 + b_2 c_2}; i = 1, 2, \dots \quad (3.24)$$

em que, q_s^* é a capacidade de saturação da monocamada do adsorvente e b_i é a constante de equilíbrio de adsorção ou coeficiente de distribuição. A constante de Henry (H_i) para o componente i é dada pelo produto. $q_s^* b_i$.

3.6.3 - Modelo bi-Langmuir competitivo

O modelo de isoterma bi-Langmuir competitivo assume que a superfície da FEQ contém dois diferentes tipos de sítios; sítios não-seletivos, que retêm ambos os enantiômeros com a mesma energia de adsorção e sítios enantiosseletivos que interagem diferentemente com estes dois enantiômeros, ligando-se a eles com diferentes energias (com igual ou diferente capacidade de saturação). Assim, as constantes de equilíbrio dos dois enantiômeros nos sítios não-seletivos são iguais e o modelo bi-Langmuir possui apenas cinco parâmetros neste caso. A Equação 3.25 deduz a existência desses dois sítios de ligação presente na superfície da fase estacionária.

$$q_i = q_{ns} \frac{b_{i,ns}c_i}{1+b_{i,ns}(c_1+c_2)} + q_s \frac{b_{i,s}c_i}{1+b_{i,s}(c_1+c_2)}; i = 1,2, \dots \quad (3.25)$$

em que, $b_{i,ns}$ é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios não-seletivos, $b_{i,s}$ é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios enantiosseletivos, q_{ns} é a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos e q_s é a capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos (FELINGER *et al.*, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002).

3.7 - Análise da termodinâmica da adsorção

A separação direta dos enantiômeros é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. Este processo pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) (ROJKOVIČOVÁ *et al.*, 2004).

As variações na energia livre de Gibbs (ΔG^0), na transferência do soluto entre as fases móvel e estacionária, são expressas pela Equação 3.26.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln \left(\frac{k}{\varphi} \right) \quad (3.26)$$

Na qual, k é o fator de retenção do soluto, φ a razão de fase na coluna (volume de fase estacionária pelo volume de fase móvel), R a constante do gases e T a temperatura absoluta. Expressando a energia de Gibbs de acordo com mudanças na entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0), o fator de retenção passa a depender da temperatura de acordo com a Equação 3.27.

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi \quad (3.27)$$

A inclinação e a intersecção do gráfico $\ln k_i$ por $1/T$, chamado gráfico de van't Hoff, permitem o cálculo dos parâmetros termodinâmicos na transferência global do soluto da fase móvel para a fase estacionária.

Geralmente na CLAE de dois enantiômeros ligados a uma dada FEQ envolve uma diferença muito pequena de energia ($<0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$) (CIRILLI et al., 2009).

A partir da diferença de energia livre de Gibbs, Equação 3.25 para os dois enantiômeros, pode-se definir o termo $\Delta(\Delta G^0)$ (Equação 3.28), que é responsável pela maior retenção do segundo enantiômero na fase estacionária quiral (BERTHOD, HE, BEESLEY, 2004). Sua expressão é alcançada pela combinação das Equações 3.26 e 3.27.

$$\Delta(\Delta G^0) = -RT \ln \alpha = \Delta(\Delta H^0) - T\Delta(\Delta S^0) \quad (3.28)$$

Os termos $\Delta(\Delta G^0)$, $\Delta(\Delta H^0)$, $\Delta(\Delta S^0)$ representam as diferenças de energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, respectivamente.

Os valores a serem obtidos para essas propriedades são de importância para o entendimento dos mecanismos de interação entre os solutos e a fase estacionária. Esse entendimento permite contribuir para modificações das condições operacionais na separação dos enantiômeros e da própria fase estacionária.

No caso de separações quirais, o fator de separação α é o fator primordial que determina a diferença relativa de retenção dos dois enantiômeros. (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais utilizados nos experimentos, juntamente com o aparato instrumental. Além disso, serão descritos os métodos aplicados para se definir a faixa de comprimento de onda utilizada, a otimização da fase móvel e a ordem de eluição dos respectivos enantiômeros presentes na mistura racêmica. Para fins didáticos, a seção foi dividida em duas partes: (i) experimentos com soluções diluídas, cujo objetivo foi obter a caracterização das colunas, isto é, a obtenção das porosidades total, do leito e da partícula, os parâmetros cromatográficos e termodinâmicos, as constantes de Henry e as curvas de van Deemter; e (ii) experimentos com soluções concentradas, visando obter a capacidade de saturação do leito cromatográfico e os parâmetros da isoterma de adsorção de Langmuir competitiva.

4.1 – Materiais

4.1.1 – Mitotano

O mitotano (Figura 4.1), comercializado como racemato, foi adquirido da Yick-Vik Chemicals and Pharmaceuticals (China). Apresenta massa molar de 320,04 g/gmol, sendo constituído pelos enantiômeros R-(+) e S(-). O estereocentro da molécula (representado pelo asterisco) está presente no átomo de carbono localizado entre os dois anéis aromáticos.

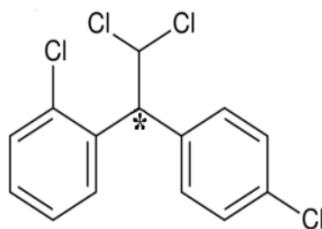


Figura 4.1 – Estrutura molecular do mitotano.

4.1.2 – Traçador

O composto 1, 3, 5-terc-butil-benzeno (Figura 4.2), conhecido como TTBB, foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), sendo inerte e apresentando massa molar de 264,44 g/gmol. Devido ao seu potencial de penetrar por todos os interstícios das partículas da coluna, sem interagir física e quimicamente com a FEQ, pode ser empregado como componente traçador na determinação da porosidade total de colunas.

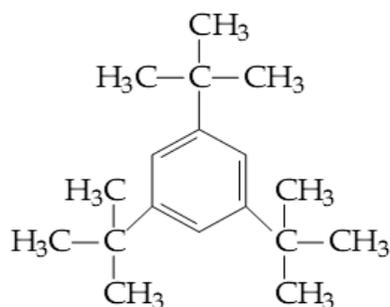


Figura 4.2 – Estrutura química do 1, 3, 5-terc-butil-benzeno (TTBB).

4.1.3 - Fase estacionária

Nas separações cromatográficas envolvendo misturas racêmicas, as fases estacionárias quirais (FEQ) constituídas por polissacarídeos (celulose e amilose, principalmente), são comumente utilizadas em diversos trabalhos reportados na literatura, por apresentarem maiores eficiências e maior capacidade de saturação (FRANCOTTE, 2001). Portanto, no presente trabalho, foram utilizadas colunas cromatográficas recheadas com as fases estacionárias tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose (250 x 4,6 mm; 5 μ m) e tris-3-5-dimetilfenilcarbamato de amilose (100 x 10,0 mm; 20 μ m), denominadas comercialmente como Lux Cellulose-2®, da Phenomenex-Alemanha (Figura 4.3) e Chiralpak® AD, da Chiral-Japão (Figura 4.4), respectivamente.

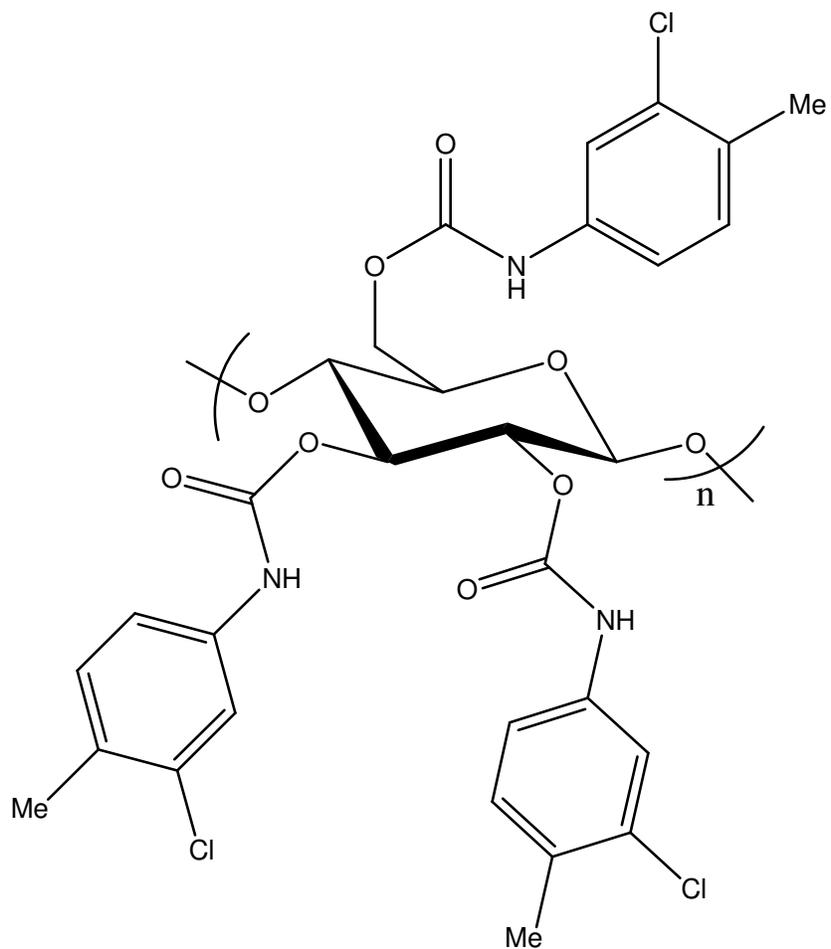


Figura 4.3 – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose.

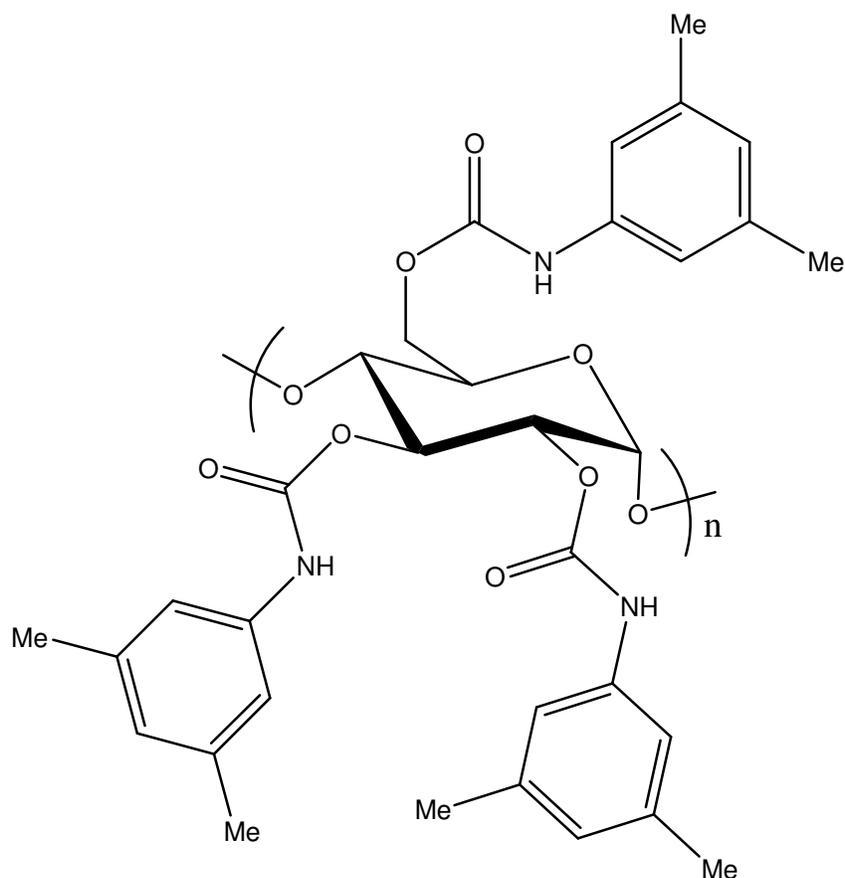


Figura 4.4 – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose.

Pode-se observar que, nas FEQ existem diferentes sítios de ligação que conferem às mesmas uma seletividade e retenção para uma infinidade de compostos quirais. Os átomos de oxigênio e nitrogênio, presentes na estrutura da FEQ, são responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio, ao passo que o átomo de cloro, por ser fortemente eletronegativo, é responsável pelas interações dipolo com os compostos quirais de interesse. A existência do fenil na estrutura dos polímeros constitui as interações do tipo π - π , enquanto que as estruturas linear da celulose e helicoidal da amilose conferem os efeitos estéricos.

4.1.4 - Fase móvel

Foram utilizados solventes orgânicos de grau HPLC para a constituição da fase móvel: n-hexano (95% pureza) e etanol (99,9% pureza), fornecidos pela Mallinckrodt (EUA); além de também ter sido utilizado o 2-propanol (100% pureza) e metanol (100% pureza), obtidos da Backer (EUA).

4.1.5 - Aparelhagem experimental

Os experimentos foram realizados num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 4.5), constituído por duas bombas da marca Shimadzu Corporation/Modelo LC-20 AT e LC-10AD (Japão) e por dois detectores: um da Shimadzu Corporation/Modelo SPD-20A (Japão) com detecção UV-VIS o outro da Jasco/Modelo CD-2095 Plus (Japão), com detecção UV-VIS acoplado em série a um dícroísmo circular. Todos os equipamentos foram integrados a um sistema de aquisição de dados utilizando o software LCsolution para a obtenção dos picos cromatográficos e quantificação dos enantiômeros do mitotano. A temperatura da coluna cromatográfica foi controlada com o auxílio de um banho termostaticado da marca Solab/Modelo SL 152 (Brasil). Foi utilizada uma balança analítica da marca Mettler/Modelo AJ150 (Suíça) e um banho ultra-sônico da marca Cole Parmer/Modelo 8892R-MT (USA) para degaseificação das fases móveis.

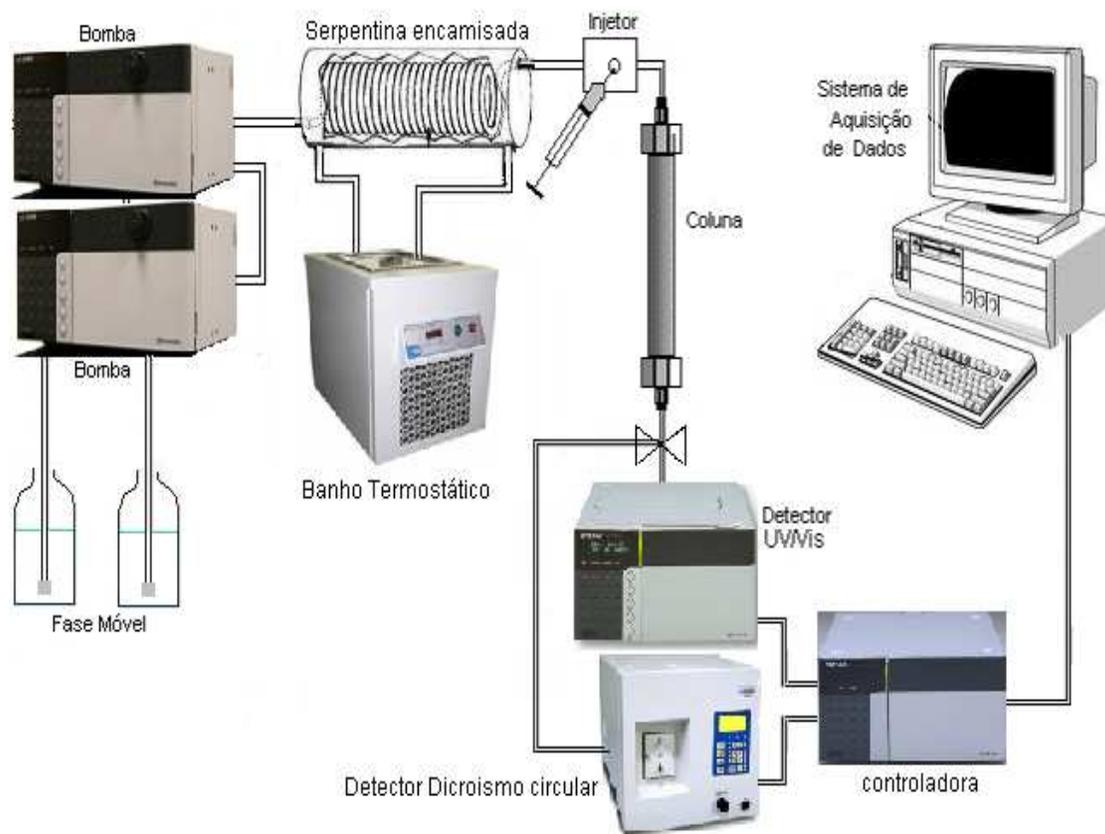


Figura 4.5 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência

4.2 – Métodos

4.2.1 - Seleção da fase móvel

Na cromatografia líquida de alta eficiência a escolha da fase móvel (FM) é de suma importância, pois a mesma desempenha um papel essencial nas separações enantioméricas. Segundo Collins et al. (2006), há três critérios a serem considerados na seleção da fase móvel: (I) características físico-químicas da fase móvel, (II) a força cromatográfica da fase móvel e (III) seletividade da FM. As colunas Lux Cellulose-2 e Chiralpak AD apresentam uma limitação específica com relação ao uso de alguns solventes orgânicos podendo, portanto, serem utilizados

somente os seguintes: alcanos (hexano e heptano), alcoóis (isopropanol, metanol e etanol) e acetonitrila.

A definição da fase móvel utilizada nos experimentos com a FEQ Lux Cellulose-2 foi, inicialmente, tomada como referência a partir do trabalho de DIAS (2007), que combinou vários solventes diferentes para identificar a fase móvel mais adequada para a separação da mistura enantiomérica. Em princípio, os experimentos na FEQ Lux Cellulose-2 foram realizados com as seguintes fases móveis, avaliadas individualmente: hexano puro, hexano/ isopropanol e hexano/etanol. Nas fases móveis proveniente das misturas do hexano com os alcoóis, as razões entre eles foram realizados nas seguintes proporções 90:10; 95:5 e 99,9:0,1% (v/v). Foram injetados 20 μ L da amostra, a uma concentração de 0,2 mg/mL com uma vazão de eluição de 1 mL/min e comprimento de onda de 270 nm para cada fase móvel preparada. Analisando as proporções de misturas do hexano com os alcoóis na fase móvel determinou-se uma razão volumétrica de 99,9:0,1% (hexano/etanol), respectivamente, como sendo a que apresentou melhor separação, mantendo-se constante até a conclusão dos experimentos.

Na FEQ Chiralpak AD a definição da fase móvel foi, inicialmente, tomada como referência de acordo com ALI e ABOUL-ENEIN (2002) que fez uso de acetonitrila e isopropanol numa proporção 50:50% (v/v). Porém, devido à indisponibilidade de acetonitrila e sua escassez no comércio, este método tornou-se inviável. A alternativa encontrada foi o uso de metanol ao invés de acetonitrila, pois ambos apresentam características semelhantes, como por exemplo, a força polar. Após a definição da fase móvel, definiram-se as proporções volumétricas de misturas entre isopropanol e metanol que foram 25:75; 50:50 e 75:25, respectivamente. Realizaram-se injeções da amostra nas seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 20 μ L, concentração da amostra de 2,0 mg/mL, vazão de 1 mL/min e comprimento de onda de 270 nm para cada fase móvel estudada. Avaliando as combinações de misturas de dois alcoóis na fase móvel determinou-se uma proporção de 60:40 (isopropanol/metanol), respectivamente, como sendo a que apresentou melhor separação e que se manteve constante até o término do trabalho.

4.2.2 - Análise de resposta do sistema de detecção

A análise de resposta do sistema de detecção foi, inicialmente, definida a partir do trabalho de DIAS (2007). Contudo, antes de iniciar os experimentos utilizando o comprimento de onda de 270 nm, empregado por Dias (2007), realizou-se uma varredura espectral na região do UV-VIS (250 e 350 nm) a fim de comprovar o comprimento de onda ideal para o desenvolvimento dos experimentos. As varreduras foram realizadas em duas soluções diferentes: a primeira numa solução de hexano/etanol (99,9: 0,1%) e a segunda numa solução de isopropanol/metanol (60: 40%) com uma concentração de 6 mg/L e 5 mg/L de mitotano, respectivamente. As medidas de absorbâncias foram determinadas num espectrofotômetro, previamente calibrado com os mesmo solventes da solução de mitotano, os quais foram, também, utilizados como referência para o branco do equipamento.

4.2.3 - Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica

Após a definição da fase móvel para cada FEQ utilizada neste trabalho, as ordens de eluição nas duas FEQ foram avaliadas através do detector de dicroísmo circular (CD), com o comprimento de onda previamente ajustado em 270 nm. As condições cromatográficas utilizadas para esta análise foram: volume de injeção de 20 µL, soluções de mitotano na concentração de 0,2 mg/mL, vazão de eluição 1 mL/min e temperatura de 25 °C na coluna Lux Cellulose-2, enquanto que, na Chiralpak AD a concentração utilizada foi de 1,04 mg/mL com a mesma condição de volume, vazão e temperatura da fase estacionária anterior.

4.2.2 – Experimentos com soluções diluídas

4.2.2.1 – Determinação da porosidade total do leito

Para a determinação da porosidade total da coluna cromatográfica foi necessário a obtenção de alguns parâmetros: (i) volume morto do sistema (volume de todo sistema cromatográfico sem a coluna) e (ii) volume total (volume de todo o sistema, inclusive a coluna), que podem ser obtidos através da injeção de um composto inerte (traçador). O produto entre o tempo de retenção do inerte (t'_{inerte}) que passa pelo sistema sem a coluna e a vazão (Q), resulta no volume morto do sistema (V_M).

O volume morto do sistema foi obtido através de um pulso cromatográfico de 20 μL de TTBB numa concentração de 0,1 mg/mL na temperatura de 25 °C, vazão de 0,2 mL/min e duas fases móveis diferentes (hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% v/v) no sistema cromatográfico sem coluna. Também foi realizado outro experimento para determinação do volume morto, mantendo-se o volume de injeção e a temperatura, enquanto que a concentração de TTBB foi de 1,01 mg/mL e vazão de 2,0 mL/min.

Da mesma forma realizaram-se pulsos cromatográficos nas mesmas condições cromatográficas anteriores, porém utilizando o sistema cromatográfico com coluna. O volume total (V_T) foi determinado a partir do produto do tempo de retenção do inerte (t_{inerte}) que passa por todo o sistema cromatográfico (inclusive a coluna) e a vazão. O valor da porosidade total foi determinado de acordo com a Equação 4.1.

$$\varepsilon_T = \frac{V_T - V_M}{V_C} \quad (4.1)$$

equação na qual, ε_T , V_T , V_M e V_C são a porosidade total do leito, o volume total do sistema cromatográfico, o volume morto e o volume total geométrico da coluna, respectivamente.

Uma segunda forma de obtenção da porosidade total é através da análise do primeiro momento, onde se realizam vários pulsos cromatográficos em diferentes vazões em um sistema cromatográfico com e sem a coluna. Na fase estacionária Lux Cellulose – 2 a faixa de variação da vazão foi entre 0,2 e 1,8 mL/min; e na Chiralpak AD foi entre 0,5 e 1,6 mL/min, por sua vez foram mantidas as mesmas condições cromatográficas utilizadas anteriormente para cada coluna estudada.

Para cada fase estacionária foram calculados os tempos de retardamento do inerte dentro da coluna a partir da diferença entre os tempos do inerte, que passa através de todo o sistema, pelo tempo do inerte excluindo a coluna do sistema cromatográfico. A porosidade total foi obtida através da construção do gráfico entre o tempo de retardamento do inerte (primeiro momento) *versus* L/u (comprimento da coluna pela velocidade linear da fase móvel). Sabendo-se que o TTBB é um composto que não interage com a FEQ, então o termo relativo à adsorção é desprezado. Portanto o coeficiente angular da Equação 3.12 é a porosidade total.

Neste trabalho, para a determinação da porosidade total, considerou-se a Equação 4.1, uma vez que não se obteve a porosidade do leito, requerida na Equação 4.2, tendo sido estimada a partir da Equação 4.2.

4.2.2.3 – Determinação da porosidade do leito e da partícula

A porosidade do leito e da partícula foram estimadas a partir da correlação de RUTHVEN (1984), em que a porosidade da partícula é definida como sendo igual a 0,45. Utilizando-se a equação da porosidade total, expressa pela Equação 4.2, foi possível estimar o valor da porosidade do leito obtida através da análise com TTBB.

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_P \quad (4.2)$$

equação na qual, ε_T , ε e ε_P é a porosidade total, a porosidade do leito e a porosidade da partícula, respectivamente.

4.2.2.4 – Determinação dos parâmetros cromatográficos

Na coluna analítica Lux Cellulose-2 os parâmetros de separação, tais como: o fator de retenção, o fator de separação, a resolução, o fator de assimetria e os números de pratos teóricos foram determinados a partir dos resultados das injeções de 20 μL do analito racêmico numa concentração de 0,2 mg/mL às vazões 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,00; 1,20; 1,40 e 1,60 ml/min. As injeções foram monitoradas por um detector UV-Vis a 270 nm, empregando-se as seguintes fases móveis: hexano puro e hexano/etanol (99,9: 0,1%). O mesmo procedimento foi aplicado à solução de TTBB, numa concentração de 1,04 mL/min, em experimentos com e sem coluna cromatográfica, na mesma fase móvel utilizada para eluição da mistura enantiomérica. Os valores dos tempos de retenção, com e sem coluna, obtidos com TTBB, serviram para corrigir os tempos de retenção da mistura racêmica.

Na coluna semi-preparativa Chiralpak AD os parâmetros cromatográficos foram obtidos com injeções de 20 μL da mistura racêmica, numa concentração de 2,0 mg/mL às respectivas vazões 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 e 1,6 mL/min. Para corrigir os tempos de retenção dos enantiômeros foram realizadas injeções com TTBB na concentração de 2,14 mg/mL às vazões 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 e 1,6 mL/min. A fase móvel utilizada nesta FEQ foi isopropanol/metanol 60:40% (v/v).

4.2.2.5 – Determinação das constantes de Henry

Os pulsos cromatográficos realizados no experimento anterior e a porosidade total obtida para o sistema foram utilizados para a determinação das constantes de Henry, conforme a Equação 4.3.

$$H_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_{\text{inerte}}}{t_{\text{inerte corrigido}}} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \quad (4.3)$$

equação na qual, $t_{R,i}$, t_{inerte} e $t_{inerte\ corrigido}$ é o tempo de retenção do enantiômero, o tempo de retenção do inerte e o tempo de retenção do inerte corrigido, respectivamente. O $t_{inerte\ corrigido}$ corresponde à subtração do t_{inerte} pelo tempo de retenção do inerte obtido por um pulso cromatográfico sem a fase estacionária (FE).

Outro método para obtenção da constante de Henry também pode ser empregado. Uma vez que os experimentos tenham sido conduzidos em soluções diluídas, o tempo de retenção de cada enantiômero é equivalente ao primeiro momento, conforme a Equação 3.12. Portanto, o coeficiente angular da curva obtida no gráfico do primeiro momento de cada enantiômero em função de L/u fornece a constante de equilíbrio. Desta forma, a partir do valor da constante de equilíbrio e a porosidade da partícula obtém a constante de Henry, conforme a Equação 4.4.

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)H_i \quad (4.4)$$

equação na qual, ε_p , K e H_i é a porosidade da partícula, a constante de equilíbrio e a constante de Henry, respectivamente.

Neste trabalho, para determinação da constante de Henry, considerou-se a Equação 4.2, pois não obteve-se o valor exato da porosidade da partícula, uma vez que utilizou-se a correlação de Ruthven (1984).

4.2.2.6 – Determinação do coeficiente de dispersão axial e do parâmetro de transferência de massa

Os coeficientes de dispersão axial (D_L) e os parâmetros de transferência de massa (k_m) foram determinados a partir dos dados obtidos nos experimentos para obtenção dos parâmetros de separação dos enantiômeros da mistura racêmica. O cálculo da eficiência da coluna (N) e altura

equivalente a um prato teórico (HETP) foram obtidos a partir das Equações 3.8 e 3.5, respectivamente.

Construindo-se o gráfico entre os valores de HETP versus a velocidade superficial (u), obteve-se a curva de van Deemter, conforme ilustra a Equação 3.18.

Os valores dos coeficientes da curva de van Deemter A, B e C foram definidos a partir das Equações 3.19, 3.20 e 3.21, respectivamente.

Os valores de k_m e D_L foram obtidos a partir dos coeficientes da curva de van Deemter e a constante de equilíbrio (K), determinada a partir do método do momento.

4.2.2.7 – Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção, com diferentes temperaturas, foram determinados a partir dos dados obtidos nos experimentos para obtenção dos parâmetros de separação cromatográfica. Na coluna analítica Lux Cellulose-2, as temperaturas analisadas foram: 15, 25, 35 e 45 °C. Na coluna semi-preparativa Chiralpak AD, as temperaturas avaliadas foram: 15, 20, 25 e 30 °C. Os parâmetros termodinâmicos de entalpia (ΔH_i^0) e entropia de adsorção (ΔS_i^0) para o par enantiomérico da mistura racêmica, além da temperatura isoenantiosseletiva (T_{iso}) e a diferença da variação da energia livre de Gibbs ($\Delta \Delta G^0$), foram determinados pelas Equações 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \frac{\Delta S_i^0}{R} + \ln \Phi \quad (4.5)$$

equação na qual, k_i , Φ , R são o fator de retenção do soluto, a razão de fase da coluna (volume da fase líquida por volume do seletor quiral contendo a fase estacionária), e a constante universal dos gases perfeitos (8,31447 J/mol.K), respectivamente.

$$\ln\alpha = -\frac{\Delta\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta\Delta S^0}{R} \quad (4.6)$$

equação na qual, $\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$ representam as diferenças de ΔH_i^0 e ΔS_i^0 para os pares de enantiômeros respectivamente.

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta H^0 - T\Delta\Delta S^0 = -RT\ln\alpha = -RT\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \quad (4.7)$$

equação na qual, k_1 e k_2 são os fatores de retenção para primeiro o e segundo enantiômeros desorvidos da coluna cromatográfica, respectivamente.

$$T_{\text{iso}} = \frac{\Delta\Delta H_{R,S}^0}{\Delta\Delta S_{R,S}^0} \quad (4.8)$$

4.2.3 – Experimentos com soluções concentradas

4.2.3.1 – Determinação das curvas de sobrecargas

O estudo da sobrecarga da coluna foi realizado para determinar a capacidade máxima de separação dos enantiômeros. Isto auxilia na obtenção da isoterma não linear, fornecendo dados suficientes para determinar a produtividade máxima da coluna cromatográfica. Existem dois métodos de obtenção de sobrecargas: (i) sobrecarga de concentração – onde o volume de injeção permanece constante e a concentração da amostra varia, e (ii) sobrecarga de volume – onde o volume de injeção varia e a concentração da amostra permanece constante. Um fator importante

para a sobrecarga é a solubilidade máxima dos componentes na fase móvel, pois a escolha do método dependerá da solubilidade dos componentes e do tipo de coluna, seja analítica ou semi-preparativa.

Os experimentos realizados neste trabalho levaram-se em consideração os dois métodos citados anteriormente. Para a coluna analítica Lux Cellulose-2, utilizou-se o método de sobrecarga de concentração, mantendo-se o volume de injeção constante de 20 μL e variando-se a concentração da mistura racêmica: 2,0; 4,0; 6,0; e 10,0 g/L. Já, para a coluna semi-preparativa Chiralpak AD, utilizou-se o método de sobrecarga de volume, mantendo-se a concentração da amostra constante de 100 g/L e variando-se o volume de injeção utilizado: 20; 50; 100 e 200 μL .

4.2.3.2 – Determinação das isotermas de adsorção

O método utilizado na determinação da isoterma não linear consistiu na obtenção dos tempos de retenção dos pulsos analíticos, e dos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos, formados pelas injeções de sobrecarga, conforme ilustra a Figura 4.6.

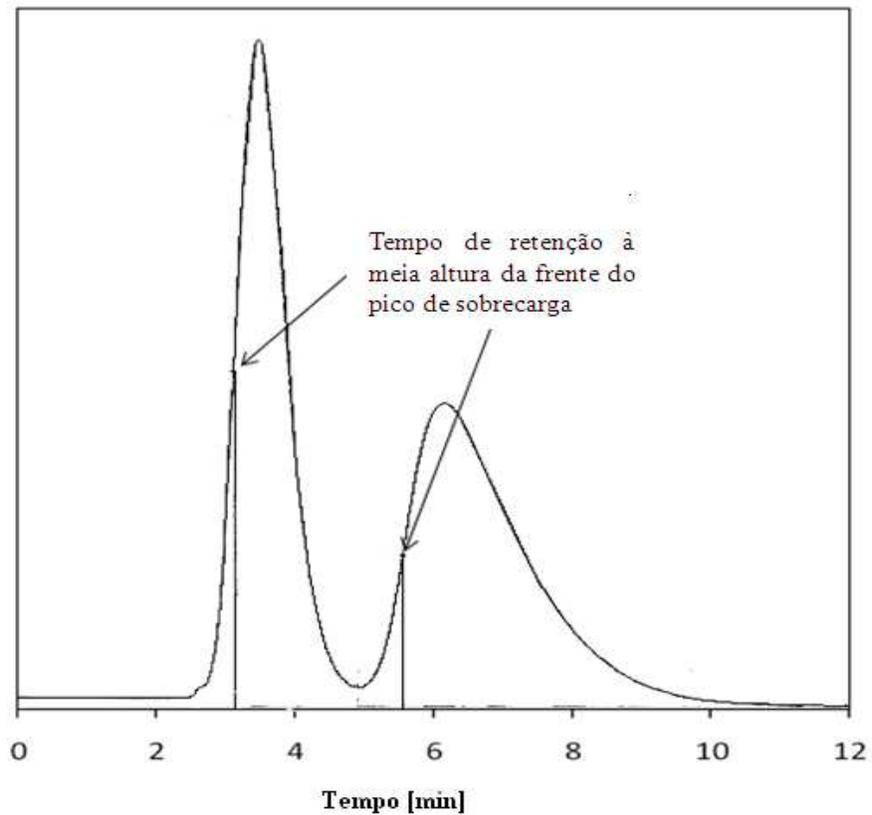


Figura 4.6 – Visualização de picos cromatográficos durante o experimento para a obtenção das curvas de sobrecarga.

Os tempos de retenção obtidos, tanto no modo analítico quanto no modo de sobrecarga para as duas FEQ estudadas, foram inseridos no software Help, desenvolvido pela Novasep. Esse programa baseia-se no trabalho de Nicoud e Seidel-Morgenstern (1996) e considera uma isoterma que representa a adsorção competitiva e não competitiva em diferentes sítios de adsorção, que é característica de separações quirais. A quantidade de espécies adsorvidas em sítios não específicos é linearmente dependente da concentração da fase móvel, como pode ser visto na Equação 4.9.

$$q_i = \lambda_i C_i + \frac{q^* \beta_i C_i}{1 + \beta_1 C_1 + \beta_2 C_2} \quad (4.9)$$

equação na qual, λ_i , q_i^* , q_i e β_i são a constante de adsorção linear para um componente i , capacidade máxima de adsorção dos sítios enantiosseletivos (g de soluto por litro de fase estacionária), concentração do soluto para uma definida fase estacionária (g de soluto por litro de fase estacionária) e a constante de adsorção não linear do componente i , respectivamente.

Determinaram-se os tempos de retenção dos enantiômeros para a fase estacionária Lux Cellulose-2 a partir da injeção de 20 μ L de uma solução 0,2 g/L do racemato e vazão de 1,0 mL/min. Para a fase estacionária Chiralpak AD, determinaram-se os tempos de retenção através da injeção de 20 μ L de uma solução 2,0 g/L do racemato e vazão de 2,0 mL/min. Os tempos de retenção à meia altura da frente dos pico de sobrecarga, foram determinados a partir de pulsos cromatográficos, para cada fase estacionária, conforme descrito no tópico anterior.

Deve-se ressaltar que, na injeção da sobrecarga, a sobreposição dos picos não foi inferior a 10% da altura do pico, garantindo assim uma aceitável precisão com relação à estimativa da isoterma de adsorção. O processo para a determinação dos parâmetros da isoterma modificada bi-Langmuir competitiva no software HELP, foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

(i) Inicialmente, na janela de entrada do software “HELP” (Figura 4.7), inseriu-se as medidas dos parâmetros da coluna (diâmetro, comprimento, porosidade da coluna e o tamanho da partícula) e a condição de injeção analítica (vazão e tempo de retenção dos enantiômeros).

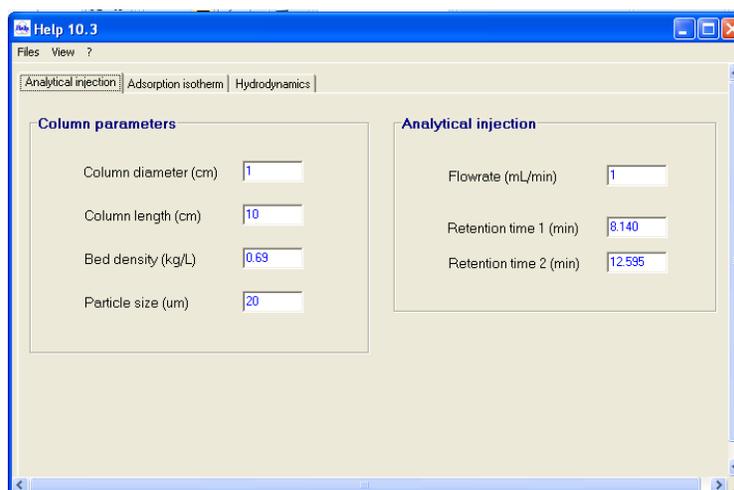


Figura 4.7 – Janela de entrada de dados do software “HELP” que se refere às medidas dos parâmetros da coluna e a injeção analítica.

(ii) Numa outra janela (Figura 4.8), inseriram-se os dados das injeções de sobrecarga (vazão, volume de injeção, concentração dos enantiômeros e os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos). Em seguida, pressionou-se o botão “calculate” para obtenção dos valores dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitiva. Na seqüência, pressionou-se o botão “verify” para estimativa dos tempos de retenção em função da quantidade injetada e os tempos experimentais, conforme ilustra a Figura 4.9.

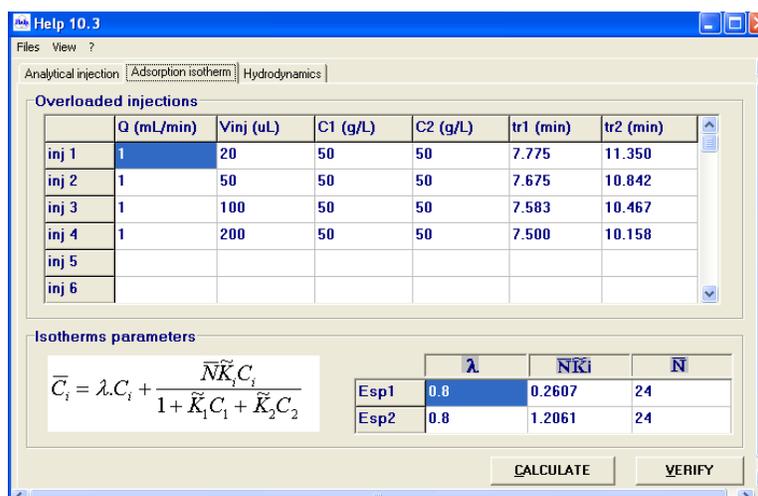


Figura 4.8 – Janela de entrada e saída dos dados do software HELP, que se refere às medidas de sobrecarga e os parâmetros da isoterma de adsorção.

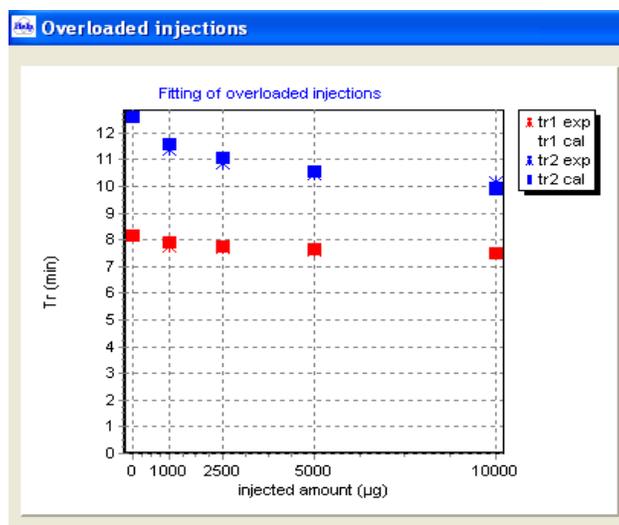


Figura 4.9 – Curva dos tempos de retenção em função da quantidade injetada sobre condições de sobrecarga, obtida através do software HELP.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos de acordo com os métodos descritos na seção anterior enfocando o estudo do comportamento das fases estacionárias utilizadas, variando-se a vazão e temperatura. Também são expostos os parâmetros termodinâmicos, de transferência de massa e os de equilíbrio das isothermas de adsorção linear e não-linear.

5.1 – Seleção da fase móvel

Os primeiros experimentos foram realizados com hexano puro (Figura 5.1) conduzidos na fase estacionária Lux Cellulose-2, das quais foram obtidos valores de 1,95 e 1,136 para a resolução e fator de separação, respectivamente. Estes parâmetros foram obtidos experimentalmente a partir de um pulso cromatográfico de 20 μ L da solução com concentração 0,2 mg/mL e vazão de eluição 1,0 mL/min, medido no comprimento de onda (λ) de 270 nm e temperatura de 25 °C.

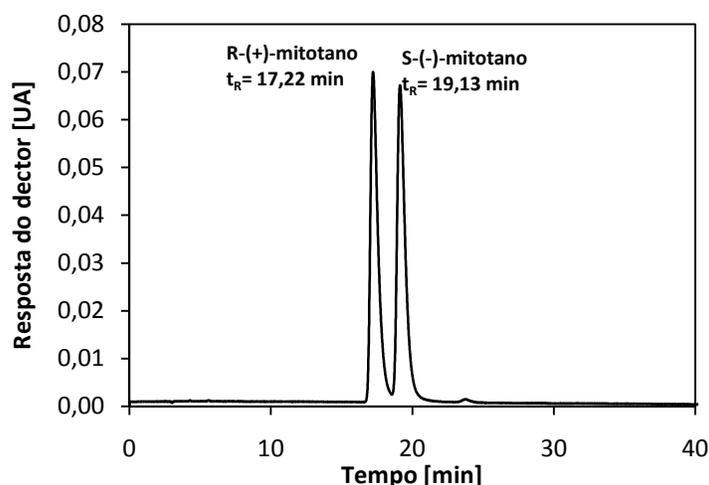


Figura 5.1 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base polissacarídeo tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com a fase móvel hexano, numa vazão de 1,0 mL/min e comprimento de onda igual a 270 nm na temperatura de 25 °C.

Com o objetivo de otimizar o tempo de resolução dos enantiômeros do mitotano, foram adicionados modificadores polares (isopropanol e etanol) miscíveis na FM hexano em diferentes proporções. A mistura de hexano e isopropanol foi empregada na separação dos enantiômeros do mitotano com a FEQ Lux Cellulose-2, porém, nenhuma das proporções utilizadas apresentou separação. A falta de resolução com a fase móvel hexano/isopropanol, pode ser atribuída ao álcool presente na FM, uma vez que o isopropanol age como um competidor pelos sítios ativos da fase estacionária. Conseqüentemente, ligações de hidrogênio serão formadas entre os grupos hidroxila do álcool e o oxigênio presente na fase estacionária, possibilitando a existência de uma maior interação com a fase estacionária quando comparada com os enantiômeros da mistura racêmica. Supõe-se que, haja uma maior afinidade (força de interação) da FM com a FEQ, assim, como os enantiômeros possuem menor afinidade com a FEQ em relação a FM, então, espera-se que ocorra uma rápida eluição sem que haja a separação dos mesmos.

Por outro lado, a mistura hexano/etanol 90:10% (v/v) apresentou sinal de separação dos enantiômeros do mitotano (Figura 5.2), havendo, portanto, a formação de duas bandas levemente sobrepostas. Foi observado (Figura 5.3) que uma diminuição da fração de etanol na FM aumentava os valores dos parâmetros de resolução e o fator de separação (α).

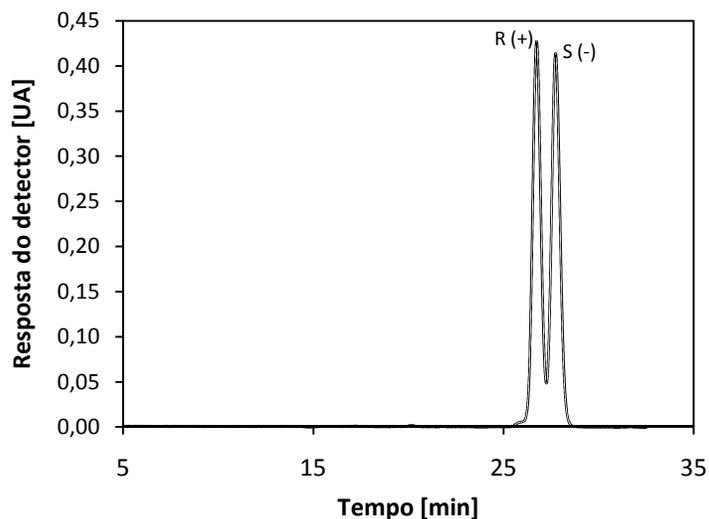


Figura 5.2 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base polissacarídeo tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com a fase móvel hexano + 10% de etanol, numa vazão de 0,2 ml/min e comprimento de onda igual a 270 nm na temperatura de 25 °C.

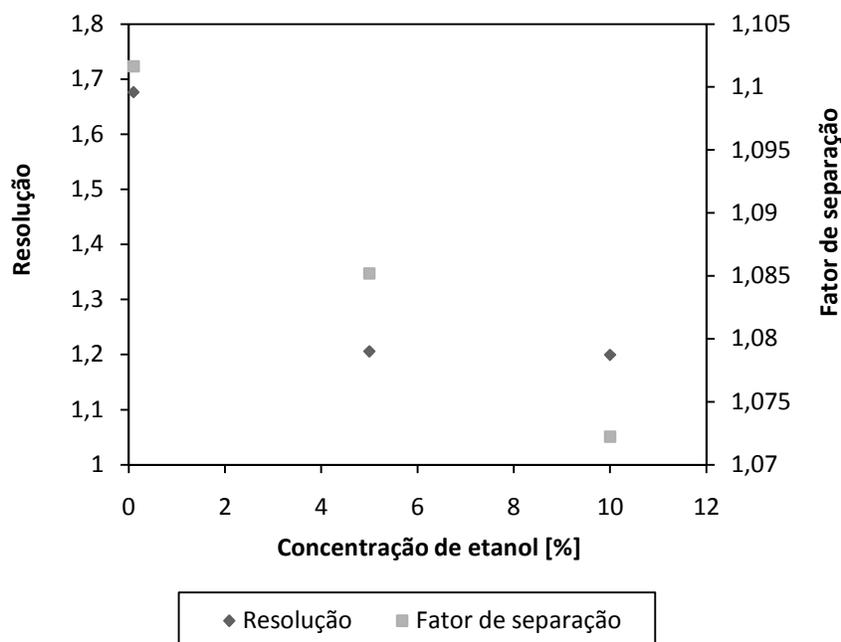


Figura 5.3 – Variação da resolução e fator de retenção em função da % de etanol, medido numa vazão de 0,2 mL/min, comprimento de onda de 270 nm e temperatura de 25 °C.

A Tabela 5.1 mostra com detalhes os valores dos fatores de retenção, fatores de separação e resoluções obtidas na coluna Lux Cellulose-2 com a FM hexano/etanol em diferentes proporções.

Tabela 5.1 – Variação do fator de retenção, fator de separação e resolução em função da concentração da fase móvel obtidos numa vazão de 1,0 mL/min.

Hexano/etanol % (v/v)	Fator de retenção		Fator de separação (α)	Resolução
	$k_{R(+)}$	$k_{S(-)}$		
90/10	1,092	1,170	1,072	1,20
95/5	0,831	0,901	1,085	1,20
99,9/0,1	1,536	1,693	1,102	1,68

Foi visto anteriormente que com a adição de isopropanol em hexano não foi possível obter separação, ao passo que com etanol, obteve-se uma melhor resolução. A diferença de

resolução pode ser explicada pela polaridade da molécula do álcool. O etanol, por possuir uma cadeia alquila menor que o isopropanol, o que lhe confere maior polaridade com os sítios ativos da FEQ que possibilita maior interação dos enantiômeros do mitotano com os sítios ativos da coluna, ocorrendo à separação.

Outro fator verificado na separação dos enantiômeros com a fase estacionária Lux Cellulose-2, foi o tempo de retenção (Figura 5.4). Observou-se que, ao aumentar a fração de etanol na mistura hexano/etanol, o tempo de retenção esperado de ambos os enantiômeros diminuía. Vale ressaltar que os tempos de eluição para o enantiômero R-(+)-mitotano apresentaram valores distintos, ou seja, enquanto utilizava-se apenas hexano como fase móvel, o tempo de eluição foi de 17,22 min ao passo que, com a adição de etanol na proporção de 0,1 % (em volume), o tempo reduziu consideravelmente para 7,78 min.

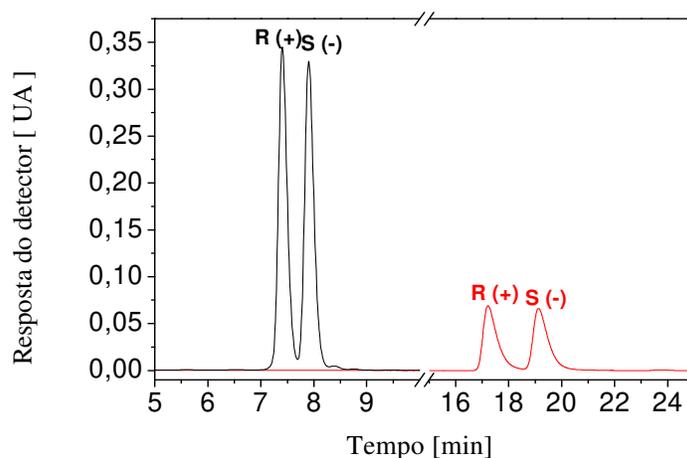


Figura 5.4 – Cromatograma obtido experimentalmente em duas fases móveis diferentes: (linha escura) Hexano + 0,1% de etanol e (linha vermelha) Hexano puro (volume injetado de 20 μ L, vazão de 1,00 mL/min e temperatura de 25 °C).

Na coluna cromatográfica Chiralpak AD a fase móvel, inicialmente utilizada, foi acetonitrila/isopropanol 50:50% (v/v), dos quais foram determinados os parâmetros de separação R_s e α , cujos valores foram de 3,27 e 5,76, respectivamente (Figura 5.5).

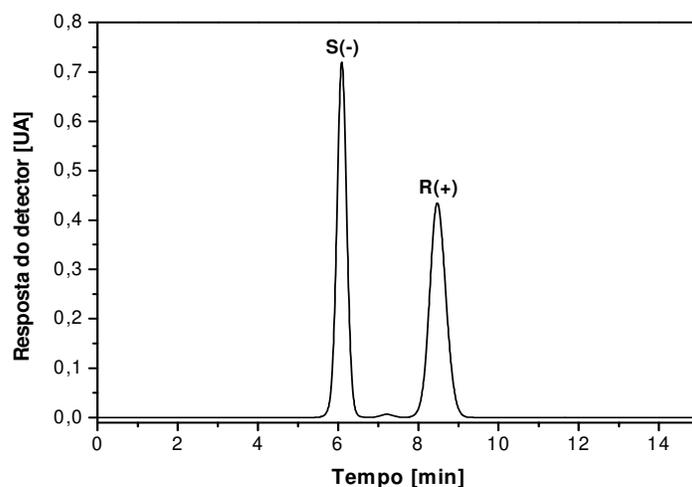


Figura 5.5 – Cromatograma da mistura racêmica do mitotano obtido experimentalmente numa base de polissacarídeo tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose com a fase móvel acetonitrila/isopropanol 50:50% (v/v); injeção de 20 μ L; concentração de 10 g/L; vazão de 1,0 ml/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 °C.

O reconhecimento quiral dos enantiômeros do mitotano com a fase estacionária tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, foi melhorada com o aumento da fração de acetonitrila na mistura. Apesar de se alcançar uma alta seletividade com acetonitrila e isopropanol, outro experimento foi realizado com metanol e isopropanol, devido à escassez de acetonitrila no mercado de solventes o que elevou o seu custo em relação ao álcool. Embora a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) apresentasse relativamente uma baixa solubilidade da mistura racêmica de mitotano (120 g/L), a fase móvel isopropanol/acetonitrila 75:25 (v/v) atingiu valores de solubilidade expressivamente maiores (360 g/L). Além disso, a solubilização de mitotano na mistura dos alcoóis só foi possível com o auxílio de um ultrassom, enquanto que com isopropanol e acetonitrila somente com uma agitação manual foi necessária.

Os experimentos com os solventes isopropanol e metanol foram realizados em três diferentes proporções, como abordado no tópico 4.2.1.1. As Figuras 5.6 e 5.7 mostram a variação da resolução em função da proporção volumétrica entre isopropanol e metanol.

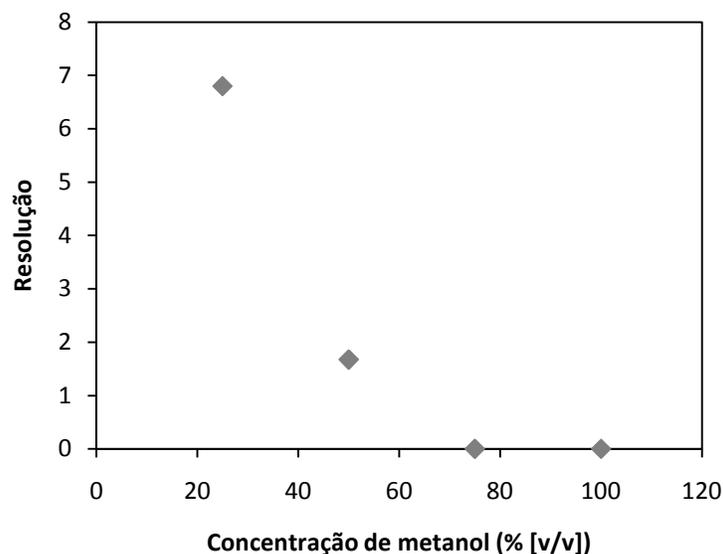


Figura 5.6 – Variação da resolução em função da concentração de metanol na fase móvel.

Na Tabela 5.2 são apresentados os respectivos valores dos fatores de retenção, fatores de separação e resolução, obtidos na coluna Chiralpak AD com a FM isopropanol/metanol em diferentes proporções. Nota-se que em concentrações superiores a 75% de metanol, não foi possível separar os enantiômeros. Por sua vez, em concentrações mais baixas do álcool na mistura, a resolução e o fator de separação dos enantiômeros aumentavam. Apesar da existência de uma considerável resolução entre eles, com uma maior porcentagem de isopropanol presente na fase, o trabalho foi desenvolvido com uma proporção intermediária, correspondendo 60:40 (v/v) de isopropanol/metanol.

Tabela 5.2 – Variação do fator de retenção, fator de separação e resolução em função da concentração da fase móvel

Isopropanol/metanol % (v/v)	Fator de retenção		Fator de separação (α)	Resolução
	$k_{S(-)}$	$k_{R(+)}$		
75/25	0,40	3,19	7,9	6,8
50/50	0,37	0,62	1,66	1,67
25/75	0,48	0,48	1	0,0
100*	0,49	0,49	1	0,0

(*) Este valor refere-se a uma fase móvel constituída apenas por metanol.

5.2 - Análise de resposta do sistema de detecção

Uma solução contendo a mistura racêmica de mitotano foi submetida a um espectro ultravioleta, através de teste de varredura, para determinação do comprimento de onda máximo sob o qual o fármaco absorve. Foram encontrados os valores de 260 e 270 nm para a absorção máxima do mitotano em fase móvel constituída por isopropanol/metanol 60:40 % (v/v) (Figura 5.7) e hexano/etanol 99,9/0,1% (v/v) (Figura 5.8), respectivamente. Apesar da obtenção de dois comprimentos de onda distintos, os estudos foram conduzidos a 270 nm.

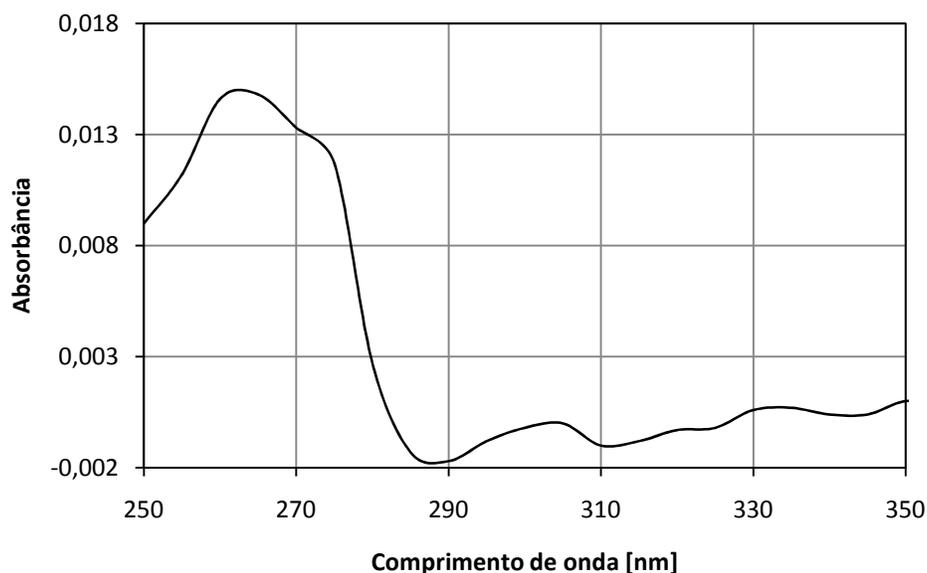


Figura 5.7 – Espectro de varredura da solução de mitotano racêmico. Concentração de 6 mg/L na fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).

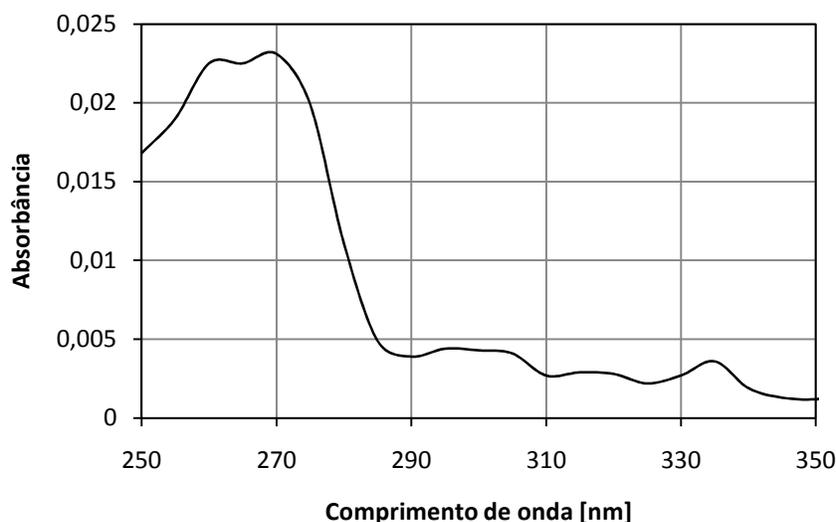


Figura 5.8 – Espectro de varredura da solução de mitotano racêmico. Concentração de 6 mg/L na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).

5.3 - Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica

A determinação da ordem de eluição foi realizada num detector de dicroísmo circular (CD) em série com um detector UV-VIS. Nesta condição foi possível detectar os dois sinais dos picos formados pelo CD e UV-VIS. Houve uma diferença de sensibilidade entre os dois detectores, sendo que o CD apresentou uma menor sensibilidade em relação ao UV-VIS, cuja altura do pico no CD foi menor em relação ao detectado pelo UV-VIS. No trabalho realizado por Dias (2007) foi relatado que a intensidade dos picos entre UV-VIS e CD formados não foi tão significativa como o observado na presente dissertação. Talvez este desvio tenha sido causado pela condição da lâmpada, ou seja, ela tinha mais horas de uso quando foi utilizada no desenvolvimento desta dissertação. Além disso, verificou-se que, o primeiro e o segundo pico formado correspondiam aos enantiômeros S(-) e R(+), respectivamente (Figura 5.10). Por outro lado, no presente trabalho (Figura 5.11), observou-se que houve uma inversão da ordem de eluição, ou seja, o enantiômero R(+) eluiu primeiro. O motivo atribuído a esta inversão deve-se à mudança da fase estacionária utilizada (Lux Cellulose-2), uma vez que a fase móvel empregada foi idêntica à utilizada no trabalho de Dias (2007).

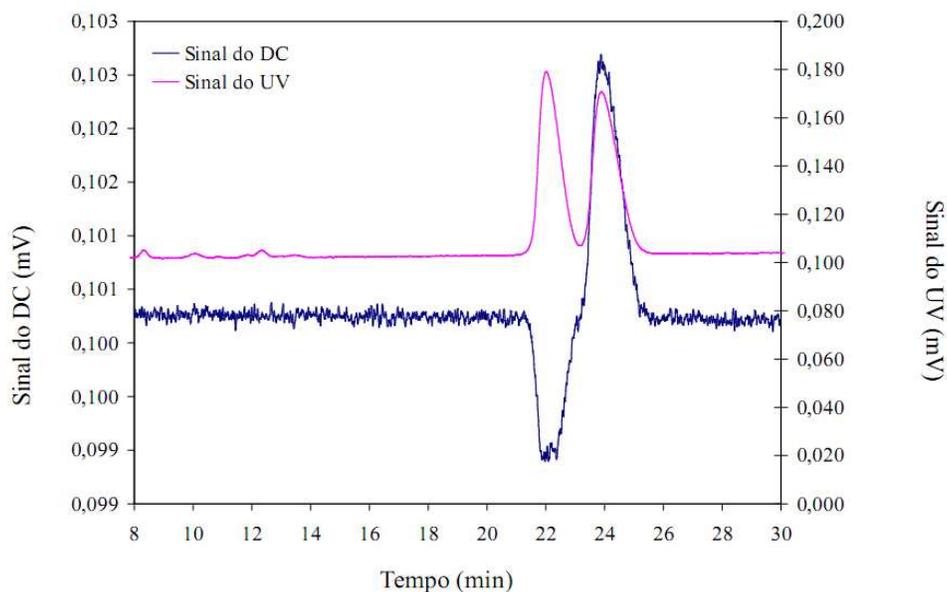


Figura 5.9 – Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano detectado, na fase móvel hexano puro, no CD e UV formado a partir de uma injeção de 200 μL , vazão de 2,0 mL/min e comprimento de onda 270 nm. DIAS (2007).

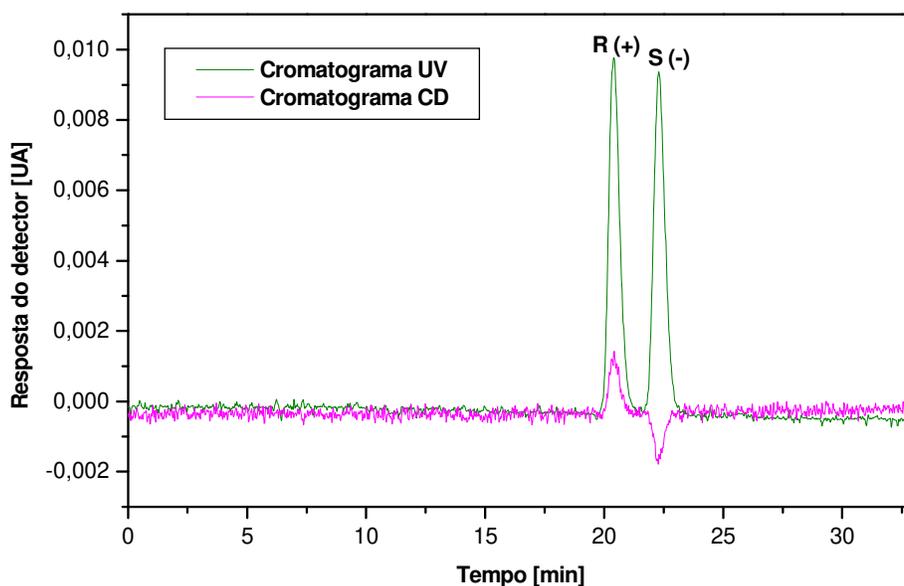


Figura 5.10 - Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano, na fase móvel hexano puro, detectado no CD e UV; injeção de 20 μL da solução; concentração de 0,2 g/L; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

Nota-se que, na coluna Chiralpak AD, os pares enantioméricos foram eluídos de forma diferente da observada na coluna Lux Cellulose-2, o qual o componente menos retido tratava-se do enantiômero S(-) devido à rotação do plano da luz ser negativa. Portanto, o mais retido referiu-se ao enantiômero R(+) com rotação positiva no plano da luz. A Figura 5.11 apresenta a conformação dos picos determinados com os detectores de CD e UV – Vis, em que é mostrada a inversão da eluição dos enantiômeros do mitotano. A mudança no perfil de eluição entre as colunas Lux Cellulose-2 e Chiralpak AD devem-se a alteração do leito empacotado ou da fase móvel utilizada. Nos estudos reportados por Wang *et al.*, (2000) foi verificado que a mudança da fase móvel ocasionou a inversão da ordem de eluição.

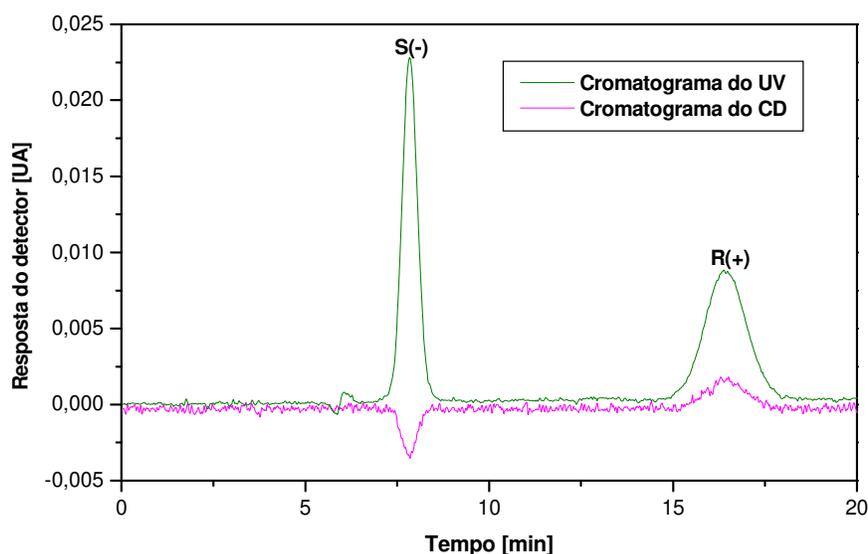


Figura 5.11 - Perfil de eluição dos enantiômeros do mitotano, na fase móvel isopropanol/metanol (60:40%, v/v), detectado no CD e UV; injeção de 20 μ L da solução; concentração de 1,04 g/L; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 $^{\circ}$ C.

5.4. – Experimentos com soluções diluídas

5.4.1 - Determinação das porosidades total (ϵ_T), do leito (ϵ) e das partículas (ϵ_P)

A porosidade total (ϵ_T) foi determinada a partir de pulsos cromatográficos como discutido no tópico 4.2.2.1. O valor obtido da porosidade total da coluna Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) foi de $0,684 \pm 0,007$. Com a mesma fase estacionária acima citada, porém com a fase móvel hexano puro, a porosidade total encontrada foi de $0,689 \pm 0,007$. As Tabelas 5.3 e 5.4 mostram as vazões e os respectivos volumes totais (V_T) e mortos (V_M) obtidos na coluna Lux Cellulose-2 com as duas fases móveis anteriormente descritas. As porosidades totais das colunas cromatográfica utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da Equação 4.1.

Tabela 5.3 – Porosidade total da fase estacionária Lux Cellulose – 2 com fase móvel hexano/etanol 99,9:0,01 (v/v) na temperatura de 25 °C.

Q (cm ³ /min)	V _T (cm ³)	V _M (cm ³)	ϵ_T
0,2	3,004	0,184	0,679
0,3	3,013	0,189	0,680
0,4	2,999	0,186	0,678
0,5	3,031	0,185	0,686
0,6	3,052	0,194	0,689
0,8	3,064	0,194	0,692
1,0	3,030	0,202	0,681
		Média	$0,684 \pm 0,007$

Tabela 5.4 – Porosidade total da fase estacionária Lux Cellulose – 2 com fase móvel hexano puro na temperatura de 25 °C.

Q (cm ³ /min)	V _T (cm ³)	V _M (cm ³)	ε _T
0,5	2,999	0,185	0,678
0,6	3,051	0,194	0,688
0,8	3,064	0,194	0,692
1,0	3,030	0,202	0,681
1,2	3,080	0,197	0,695
1,4	3,078	0,196	0,694
1,6	3,093	0,205	0,696
Média			0,689 ± 0,007

Pode-se observar que, a porosidade total obtida na fase móvel hexano puro e hexano/etanol são distintas. Fazendo-se o teste t entre os valores médios encontrados, para um intervalo de confiança de 95%, tem-se que, o valor de t de student tabelado (t_{tab}) é igual a 12,71. O valor de t calculado (t_{calc}) foi obtido a partir da Equação 5.1.

$$t_{calc} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \quad (5.1)$$

equação na qual \bar{x} , μ , σ e n correspondem a média amostral, média do valor teórico, desvio padrão e o número de amostra. O t_{calc} corresponde a 0,9998. Como o valor de $t_{calc} < t_{tab}$, pode-se dizer, então, que não há diferença significativa entre as duas porosidades encontrada com as diferentes fases móveis.

Na coluna Chiralpak AD a porosidade total encontrada foi de $0,686 \pm 0,003$. A Tabela 5.5 mostra as vazões e os respectivos volumes totais (V_T) e mortos (V_M) obtidos na coluna Chiralpak AD com a fase móvel constituída pelos solventes isopropanol/metanol 60:40% (v/v). Mihlbachler *et al.* (2006), trabalhando com a mesma fase estacionária obteve uma porosidade total de 0,648 enquanto que no trabalho reportado por Zabka e Rodrigues (2007), obteve-se um valor de 0,610.

Uma justificativa plausível na diferença dos valores de porosidade pode ser atribuída às condições distintas sob as quais as colunas foram recheadas.

Tabela 5.5 – Parâmetros obtidos experimentalmente para determinar a porosidade total da fase estacionária Chiralpak AD com fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) na temperatura de 25 °C.

Q (cm ³ /min)	V _T (cm ³)	V _M (cm ³)	ε _T
0,4	5,558	0,190	0,684
0,6	5,574	0,203	0,684
0,8	5,574	0,194	0,685
1,0	5,594	0,202	0,687
1,2	5,636	0,217	0,690
1,4	5,572	0,210	0,683
Média			0,686 ± 0,003

Para as temperaturas de 15, 20, 30 e 45 °C não houve a necessidade em se determinar a porosidade total, pois conforme relatado por Lao; Gan (2008), a porosidade total, após a correção termodinâmica de expansão do solvente não sofre modificação com a variação da temperatura, ou seja, a porosidade é um parâmetro hidrodinâmico que depende somente do tamanho dos poros, diâmetro da partícula e da densidade do recheio.

A porosidade do leito (ε) nas colunas Lux Cellulose-2 e Chiralpak AD foi estimada a partir da Equação 4.3 juntamente com a correlação de Ruthven (1984), em que a porosidade da partícula (ε_p) é aproximadamente 0,45. Neste trabalho não foi possível determinar, experimentalmente, a porosidade do leito, visto que faltavam informações mais detalhadas a respeito do leito cromatográfico.

Portanto, a porosidade do leito estimada para a coluna Lux Cellulose – 2 com as fases móveis hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) foram 0,44 e 0,413, respectivamente, ao passo que na coluna Chiralpak AD a porosidade do leito foi de 0,429.

Sartor (2006) determinou a porosidade do leito da FEQ Kromasil CHI-TBB a partir do composto poliestireno dissolvido em tetrahidrofurano (THF). Como o THF é um solvente

extremamente forte e capaz de destruir as fases quirais Lux Cellulose – 2 e Chiralpak AD, não foi possível determinar a porosidade do leito pelo mesmo método.

5.4.2 - Determinação dos parâmetros cromatográficos

As Tabelas 5.6 e 5.7 apresentam os dados dos fatores de retenção (k) e de separação (α) obtidos na coluna Lux Cellulose–2 com as fases móveis hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em diferentes temperaturas. Pode-se observar que, quando se acrescentou etanol em hexano, o fator de retenção obtido na temperatura de 25 °C para o enantiômero R-(+)-mitotano reduziu de 5,12 para 1,30. Essa redução pode ser justificada pela adição de etanol na fase móvel o que provoca uma diminuição na interação do soluto com a fase estacionária. Por esta razão é que os modificadores polares são utilizados, justamente para aumentar a força cromatográfica e diminuir a retenção dos componentes da mistura dentro da coluna de cromatografia.

Em geral, os fatores de retenção decrescem com o aumento da temperatura, mas no presente trabalho pode-se notar que, com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v), essa variação não ocorreu. Foi observado que os fatores de retenção dos enantiômeros estudados diminuíram com o aumento da temperatura (Tabela 5.7). Provavelmente a causa dessa diminuição deve-se a variação da composição da fase móvel, pois, no momento do condicionamento térmico do eluente, o etanol talvez tenha evaporado, já que se encontrava em quantidade menor na fase móvel. A mesma observação se deu para o fator de separação (ou seletividade), cujos valores aumentaram com o aumento da temperatura e esta causa também pode estar relacionada à mudança da composição de etanol presente na fase móvel.

Tabela 5.6 – Fatores de retenção (k) e de separação (α) do mitotano em Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano puro em da temperatura

Temperatura (°C)	k_1 [R-(+)]	k_2 [S-(-)]	α
15	5,58	6,31	1,13
25	5,12	5,81	1,14
35	4,82	5,41	1,12
45	3,73	4,14	1,11

Tabela 5.7 – Fatores de capacidade (k) e de separação (α) do mitotano em Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em da temperatura

Temperatura (°C)	k_1 [R-(+)]	k_2 [S-(-)]	α
15	1,16	1,26	1,09
25	1,30	1,40	1,07
35	1,62	1,70	1,05
45	1,50	1,63	1,09

É válido ressaltar que o maior valor de resolução foi obtido utilizando-se a fase móvel composta por hexano puro e uma coluna Lux-Cellulose-2 operada na temperatura de 15 °C e na vazão de 0,5 mL/min (Figura 5.12). No entanto, esperava-se que a resolução diminuísse com o aumento da temperatura; contudo, o que se obteve foi um aumento da resolução a partir da temperatura de 35 °C, o que pode ser explicado pela modificação do arranjo estrutural da fase estacionária causado pela variação do efeito térmico. Por outro lado, quando se utilizou a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) observou-se um aumento na resolução com o aumento da temperatura. Este aumento pode ser atribuído a evaporação do etanol da fase móvel juntamente com a modificação conformacional da fase estacionária, uma vez que, maiores resoluções foram alcançadas utilizando-se hexano puro (Figura 5.13).

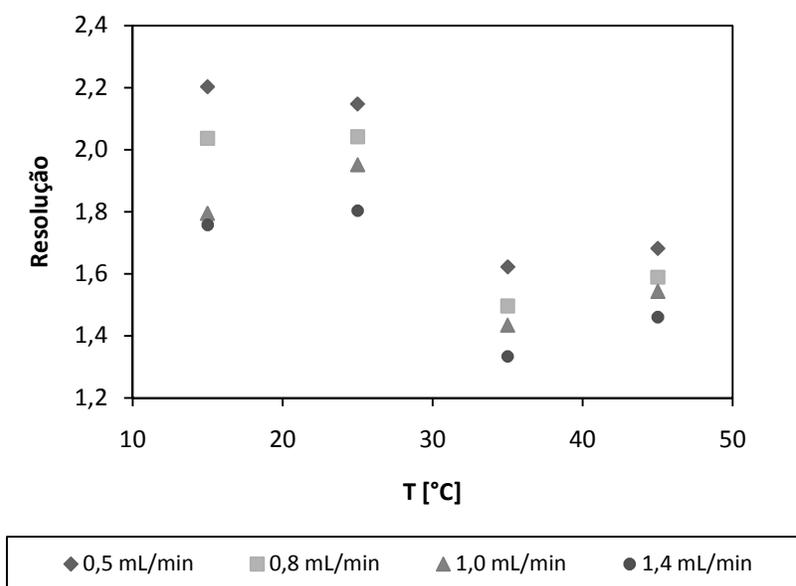


Figura 5.12 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros em função da temperatura em diferentes vazões, obtida na fase móvel hexano puro e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 μ L; concentração de 0,2 g/L ; e comprimento de onda de 270 nm.

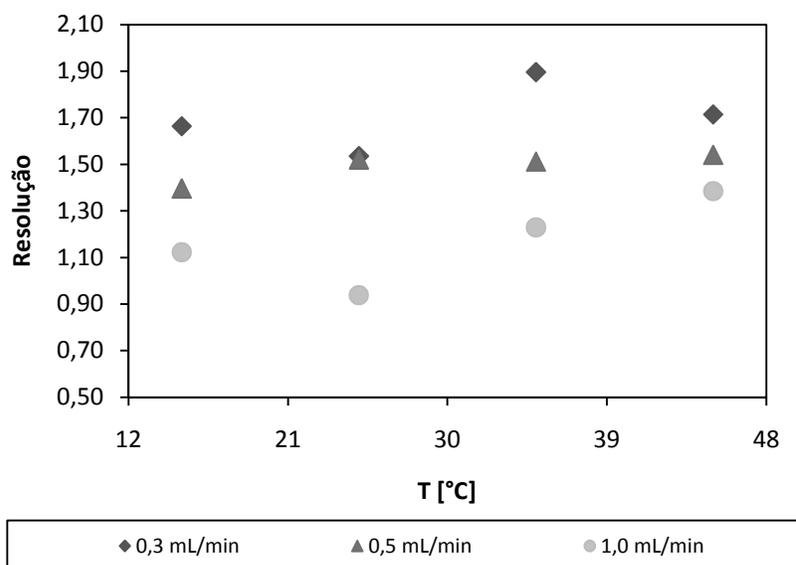


Figura 5.13 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros em função da temperatura em diferentes vazões, obtido na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 μ L; concentração de 0,2 g/L; e comprimento de onda de 270 nm.

Para os dados obtidos com a fase móvel hexano puro, o efeito da vazão sobre a resolução estudado em diferentes temperaturas (15, 25, 35 e 45 °C), mostrou que a 35 °C, a variação da resolução aumentou entre as vazões de 0,6 e 1,0 mL/min e decresceu a partir de 1,0 mL/min, voltando a aumentar com a vazão de 1,6 mL/min. Geralmente o que se observa é uma diminuição da resolução com o aumento da vazão que ocorre devido ao efeito dispersivo do pico. Ao contrário do que foi visto com as temperaturas de 15, 25 e 45 °C, provavelmente o problema da variação da resolução em função da vazão a 35 °C deve-se ao período transitório de adaptação da fase estacionária nesta temperatura, ou seja, as medidas foram obtidas antes que a coluna Lux Cellulose-2 atingisse uma transição estável (Figura 5.14).

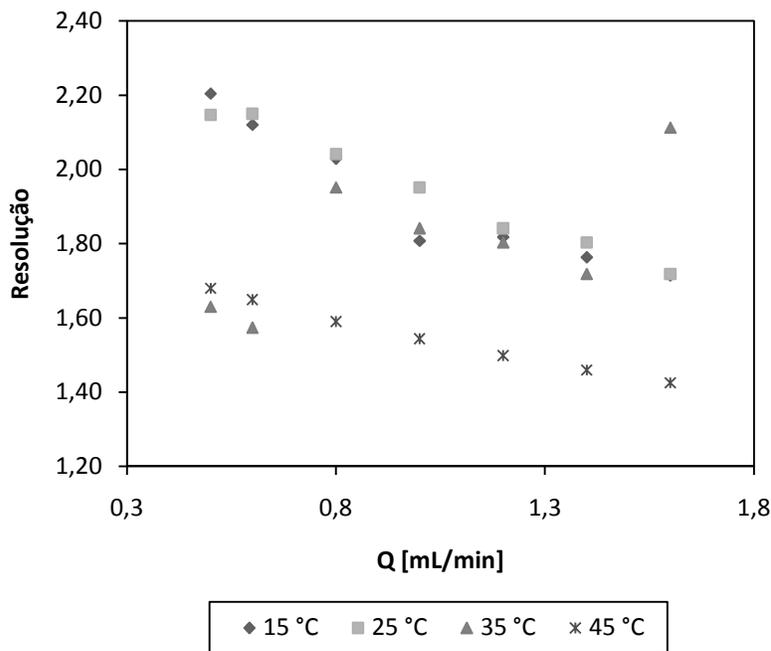


Figura 5.14 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel hexano puro e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 µL da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm.

Para a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v), a resolução tende a diminuir com o aumento da vazão, apesar de se obter melhores separações nas temperaturas de 35 e 45 °C. Conforme explicado anteriormente, em temperaturas relativamente mais elevadas, o etanol,

presente na fase móvel, pode ter evaporado, resultando em valores de resolução maiores nas temperaturas de 15 e 25 °C (Figura 5.15).

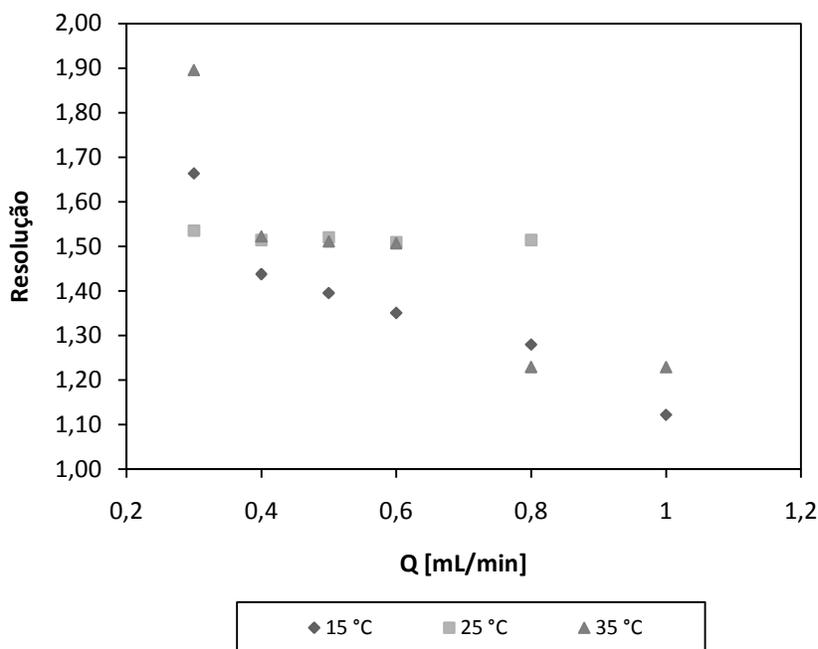


Figura 5.15 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) e fase estacionária Lux Cellulose – 2 com injeções de 20 μ L; concentração de 0,2 g/L; e comprimento de onda de 270 nm.

De acordo com os valores dos fatores de retenção (k) e de separação (α) obtidos na coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em diferentes temperaturas (Tabela 5.8), foi observado que a variação destes fatores podem ser descritas conforme as Equações 4.13 e 4.14. Vale ressaltar ainda que, nesta coluna foram alcançados fatores de separação muito superiores aos obtidos na coluna Lux Cellulose-2. Já com relação aos fatores de retenção, o enantiômero S-(-)-mitotano apresentou valores menores quando comparado ao enantiômero R-(+)-mitotano, para toda a faixa de temperatura estudada. Uma das explicações para esta observação pode estar relacionada à força cromatográfica da fase móvel que, por apresentar maior polaridade em função dos alcoóis que a constitui, permite uma eluição mais

rápida do enantiômero S-(-)-mitotano, o que, conseqüentemente, reduz a interação deste com a fase estacionária.

Tabela 5.8 – Fatores de retenção (k) e de separação (α) do mitotano em coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função da variação de temperatura

Temperatura (°C)	k_1 [S-(-)]	k_2 [R-(+)]	α
15	0,44	1,56	3,54
20	0,43	1,48	3,44
25	0,41	1,35	3,29
30	0,38	1,16	3,09

A variação da resolução em função da temperatura estudada na coluna Chiralpak AD para separação dos enantiômeros do mitotano (Figura 5.16) foi observado que, a 25 °C atingiu resolução máxima. Enquanto que, na temperatura abaixo e acima de 25 °C os valores diminuiram. Uma explicação plausível para esta variação deve-se aos efeitos enantiosseletivos que se comportam de formas diferentes quando ocorre a mudança da temperatura, isto é, ocorre uma mudança na conformação da fase estacionária provocando a diferenciação na resolução.

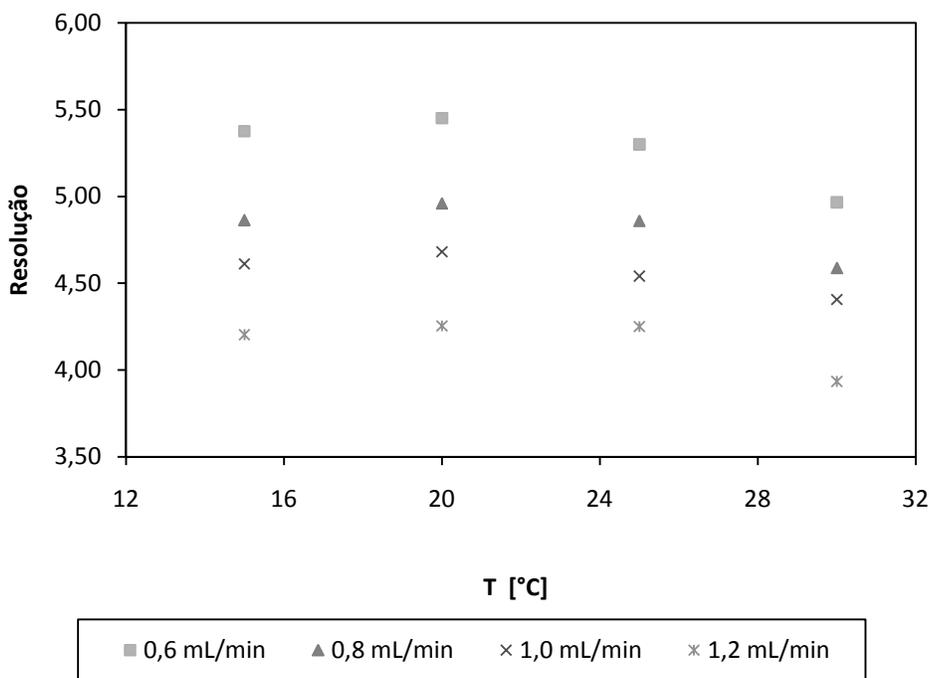


Figura 5.16 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a temperatura em diferentes vazões, obtido na fase móvel isopropanol/metanol 60:40 (v/v) e fase estacionária Chiralpak – AD com injeções de 20 μ L da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm.

Foi discutido anteriormente que, normalmente a resolução diminui com aumento da vazão devido ao efeito dispersivo dos picos. Este efeito foi observado na separação dos enantiômeros do mitotano com a coluna Chiralpak AD (Figura 5.17) em todas as temperaturas estudadas.

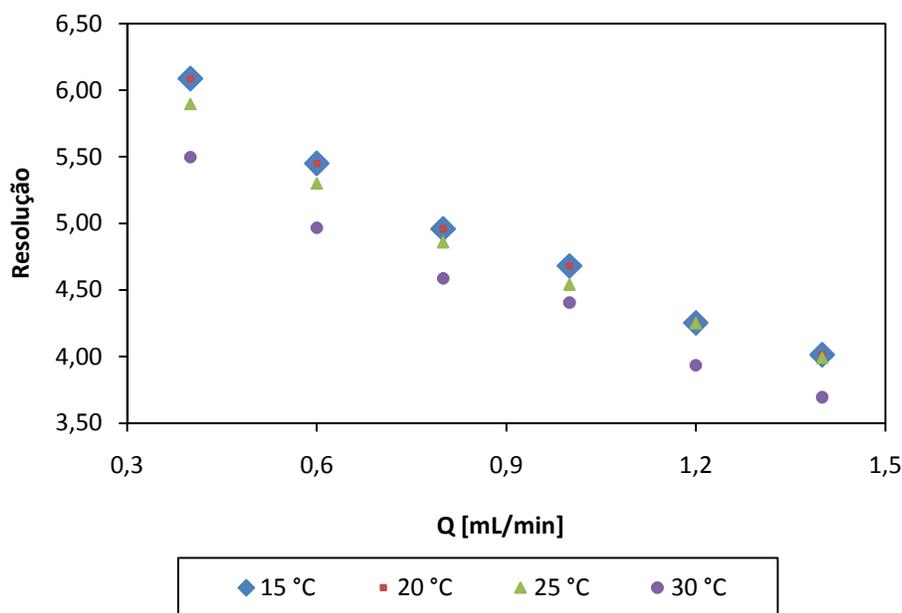


Figura 5.17 – Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão em diferentes temperaturas, obtido na fase móvel isopropanol/metanol 60:40 (v/v) e fase estacionária Chiralpak – AD com injeções de 20 μ L da solução na concentração de 0,2 g/L e comprimento de onda de 270 nm.

5.4.3 - Determinação das constantes de Henry

A Tabela 5.9 apresenta os valores das constantes de Henry (ou coeficiente de partição) obtidas em diferentes temperaturas e fases móveis. As constantes de Henry foram obtidas a partir da porosidade total juntamente com os tempos de retenção dos enantiômeros e o traçador, corrigidos conforme a equação 4.4. Em geral, a constante de Henry diminui com o aumento da temperatura; no entanto, pode ser observado nos resultados experimentais que o aumento da temperatura pôde ter levado a uma menor interação entre etanol-fase estacionária o que, conseqüentemente, acabou resultando numa maior interação entre soluto-fase estacionária. Por outro lado, com a fase móvel hexano puro os enantiômeros apresentaram uma menor interação com a fase estacionária em temperaturas mais elevadas, o que de fato, está de acordo com a literatura. Foi observado que a diferença entre os coeficientes de partição dos enantiômeros R-(+)

e S(-) foi desprezível, ou seja, notou-se que as capacidades máximas de adsorção do soluto pela fase estacionária para ambos os enantiômeros foram praticamente iguais.

Tabela 5.9 – Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna Lux Cellulose-2 em diferentes fases móveis: hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).

Fase móvel	T (°C)	Constante de Henry (H_i)	
		$H_{R(+)}$	$H_{S(-)}$
Hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v)	15	2,480±0,130	2,730±0,147
	25	2,757±0,175	3,029±0,200
	35	3,339±0,542	3,684±0,617
	45	3,260±0,112	3,582±0,127
Hexano puro	15	12,230±0,334	13,871±0,384
	25	11,268±0,401	12,795±0,469
	35	10,602±0,195	11,918±0,222
	45	8,185±0,122	9,123±0,139

A Tabela 5.10 mostra os valores das constantes de Henry obtidos na coluna Chiralpak AD. Esta coluna apresentou uma elevada diferença de interação entre os enantiômeros do mitotano em relação à coluna Lux Cellulose-2. Além disso, o decréscimo dos coeficientes de partição para o enantiômero S(-) foi menos influenciado pela temperatura que o R(+).

Tabela 5.10 – Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).

Fase móvel	T (°C)	Constante de Henry (H_i)	
		$H_{S(-)}$	$H_{R(+)}$
Isopropanol/metanol 60:40% (v/v)	15	0,960	3,405
	20	0,940	3,231
	25	0,893	2,935
	30	0,818	2,529

5.4.4 - Determinação do coeficiente de dispersão axial e do parâmetro de transferência de massa

As Tabelas 5.11 e 5.12 apresentam a quantidade dos números de pratos $N_{R(+)}$ e $N_{S(-)}$ para cada um dos enantiômeros do mitotano, obtidos na coluna Lux Cellulose-2, com as fases móveis hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em diferentes temperaturas e vazões.

Tabela 5.11 – Números de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).

Q (mL/min)	Temperatura (°C)					
	15	25	35	15	25	35
	$N_{R(+)}$			$N_{S(-)}$		
0,3	14125	13548	10817	13999	13182	11583
0,4	13008	13354	10579	13432	13192	11387
0,5	12374	12853	11957	12788	12694	12265
0,6	11257	12223	12052	12133	12108	12383
0,8	11257	10658	11888	10997	10721	11702

Tabela 5.12 – Números de pratos teóricos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)					
	15	25	35	15	25	35
	N _{R-(+)}			N _{S-(-)}		
0,5	6625	5934	4168	7218	6518	4861
0,6	6131	6493	3846	6636	7190	4501
0,8	5629	5894	3588	6104	6502	4208
1,0	4294	5261	3290	4767	5807	3842
1,2	4387	4591	3053	4776	5001	3559

Normalmente, os números de pratos aumentam com a elevação da temperatura e decrescem com o aumento da vazão (Dias, 2007; Sartor, 2006; Rosa, 2005). No entanto, no presente trabalho, observa-se um decréscimo do número de pratos teóricos com o aumento da temperatura, a uma baixa vazão da fase móvel. Os resultados podem ser justificados pelo condicionamento térmico inadequado da coluna e da fase móvel nas temperaturas analisadas, ou então, por apresentarem valores próximos do ponto ótimo da equação de van Deemter (Equação 4.8) que, possivelmente, ocasiona flutuações nos números de pratos com pequenas variações na temperatura.

As Figuras 5.18 e 5.19 mostram, a dependência de HETP com a velocidade superficial de escoamento (u) para os enantiômeros R-(+) e S-(-) obtida em diferentes temperaturas e o ajuste pelo modelo cinético da equação de van Deemter para o sistema cromatográfico constituído pela coluna Lux Cellulose-2 e pela fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v). Pode-se observar que os valores obtidos encontram-se próximo do ponto de inflexão mínimo da equação de van Deemter, indicando que os efeitos de difusão molecular são evidenciados no sistema.

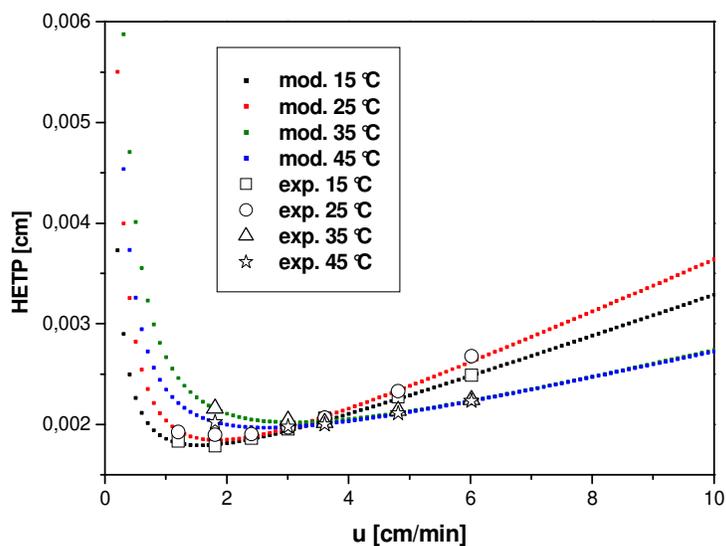


Figura 5.18 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) para o enantiômero S-(-)-mitotano. As linhas tracejadas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos (◻), (○), (Δ) e (☆) representam os dados obtidos experimentalmente.

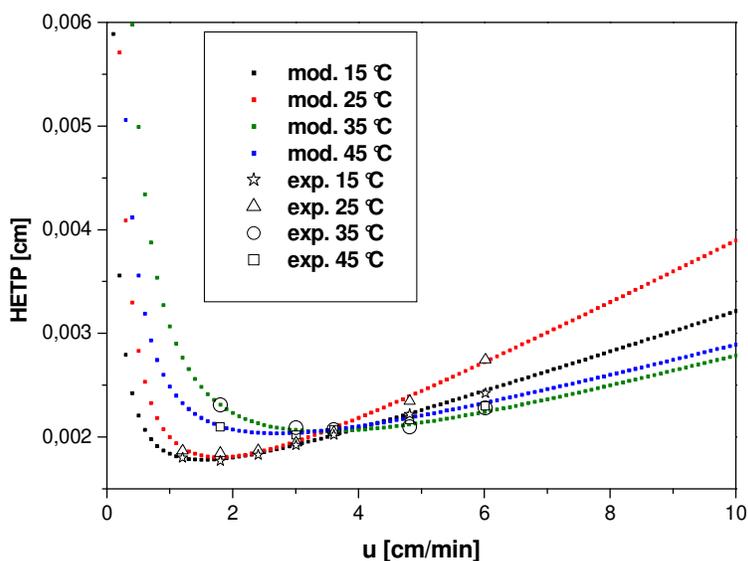


Figura 5.19 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) para o enantiômero R-(+)-mitotano. As linhas tracejadas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos representam os (☆), (◻), (Δ) e (○) dados obtidos experimentalmente.

A Tabela 5.13 apresenta os valores dos parâmetros A, B e C da equação de van Deemter com seus respectivos desvios padrão obtidos a partir da separação dos enantiômeros do mitotano.

O valor de “A” corresponde à dispersão axial das moléculas do soluto. À medida que se aumenta a temperatura, observa-se uma variação dos valores desse parâmetro, devido à variação da difusão turbilhonar causada pela diminuição da viscosidade da fase móvel (equação 4.9).

O termo “B” representa à difusividade molecular. Quando se aumenta a temperatura dentro do sistema cromatográfico essa difusividade também aumenta, ou seja, ela é diretamente proporcional a este termo (equação 4.10). No entanto, o condicionamento da coluna pôde ter ocorrido de forma inadequada, o que certamente provocou uma variação do termo “B” não condizente com a equação de van Deemter.

O parâmetro “C” representa a contribuição devido à resistência à transferência de massa que diminui com o aumento da temperatura (equação 4.11). Essa diminuição se deve ao aumento dos coeficientes globais de transferência de massa (k_m) favorecidos pela redução da viscosidade da fase móvel quando se aumenta a temperatura. Pode-se observar (Tabela 5.13) que, os valores de “C” variam a partir de 25 °C, enquanto que a 15 °C o mesmo parâmetro se mantém praticamente constante, o que pode ser justificado pelo controle inadequado da temperatura do sistema cromatográfico.

Tabela 5.13 – Parâmetros da equação de van Deemter obtidos na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em varias temperaturas diferentes

Enantiômeros	T (°C)	A	B	C
R (+)	15	$11,7 \times 10^{-4} \pm 4,0 \times 10^{-5}$	$47,0 \times 10^{-4} \pm 5,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4} \pm 6,2 \times 10^{-6}$
	25	$7,0 \times 10^{-4} \pm 13,0 \times 10^{-5}$	$9,9 \times 10^{-4} \pm 16,0 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-5}$
	35	$8,9 \times 10^{-4} \pm 18,0 \times 10^{-5}$	$20,1 \times 10^{-4} \pm 27,0 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-5}$
	45	$11,8 \times 10^{-4} \pm 6,0 \times 10^{-5}$	$11,5 \times 10^{-4} \pm 9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 8,0 \times 10^{-6}$
S (-)	15	$11,4 \times 10^{-4} \pm 5,0 \times 10^{-5}$	$5,1 \times 10^{-4} \pm 6,0 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4} \pm 8,2 \times 10^{-6}$
	25	$8,5 \times 10^{-4} \pm 11,0 \times 10^{-5}$	$9,2 \times 10^{-4} \pm 13,0 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-5}$
	35	$11,0 \times 10^{-4} \pm 12,0 \times 10^{-5}$	$14,2 \times 10^{-4} \pm 18,0 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-5}$
	45	$12,3 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-4} \pm 5,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4} \pm 4,6 \times 10^{-6}$

Segundo Wang e Ching (2002), os coeficientes de dispersão axial (D_L) para ambos os enantiômeros devem ser os mesmos. Diante dos resultados obtidos para dispersão axial observou-se essa igualdade para ambos os enantiômeros, como mostra a Tabela 5.14. A pequena diferença observada entre eles podem ser atribuídas a um erro experimental, enquanto que a diferença entre os valores de (k_m) pode ser atribuída à distinção cinética do processo de adsorção e dessorção. A coluna Lux Cellulose-2 apresenta uma eficiência muito alta, visto que a ordem de magnitude dos valores de k_m é elevada. Isto indica que a resistência a transferência de massa dentro da partícula da fase estacionária é muito pequena devido ao elevado valor de k_m encontrado.

Tabela 5.14 – Valores de D_L e k_m obtidos a partir dos coeficientes da curva de van Deemter na fase estacionária Lux Cellulose – 2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v).

Enantiômeros	T (°C)	D_L (cm ² /min)	k_m (min ⁻¹)
R (+)	15	$2,35 \times 10^{-4} + 5,85 \times 10^{-4}u$	2447,14
	25	$4,95 \times 10^{-4} + 3,50 \times 10^{-4}u$	1596,62
	35	$1,01 \times 10^{-3} + 4,45 \times 10^{-4}u$	2326,68
	45	$5,75 \times 10^{-4} + 5,90 \times 10^{-4}u$	2595,20
S (-)	15	$2,55 \times 10^{-4} + 5,70 \times 10^{-4}u$	2291,60
	25	$4,60 \times 10^{-4} + 4,25 \times 10^{-4}u$	1812,14
	35	$7,10 \times 10^{-4} + 5,50 \times 10^{-4}u$	2768,22
	45	$4,90 \times 10^{-4} + 6,15 \times 10^{-4}u$	3239,80

A Tabela 5.15 apresenta os números de pratos determinados na coluna Chiralpak AD. Ao contrario do que foi observado com a coluna Lux Cellulose-2, os resultados mostraram que os números de pratos aumentaram com o acréscimo da temperatura para uma vazão constante. Por outro lado, mantendo-se a temperatura constante e aumentando-se a vazão, o número de pratos reduziu. É importante enfatizar ainda que para os dois casos, o tempo de retenção diminuiu com o aumento da temperatura e da vazão.

Tabela 5.15 – Números de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do mitotano separados na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)					
	15	25	30	15	25	30
	N _{S-(-)}			N _{R-(+)}		
0,6	2127	2446	2595	1312	1655	1860
0,8	1776	2114	2217	1070	1357	1542
1,0	1560	1807	1983	913	1167	1322
1,2	1353	1589	1737	779	1030	1175
1,4	1202	1430	1575	692	896	1040

As Figuras 5.20 e 5.21 mostram a dependência de HETP com a velocidade superficial de escoamento (u) para os enantiômeros R-(+) e S-(-) e o ajuste através do modelo cinético da equação de van Deemter estudada na separação dos enantiômeros do mitotano com a coluna Chiralpak AD. Pode-se observar que os valores obtidos encontram-se na faixa linear da equação de van Deemter. Contudo, foi realizado um ajuste a partir do modelo acima citado e observou-se que a vazão ótima estava muito abaixo da mínima permitida na coluna, isto é, de 2,00 mL/min.

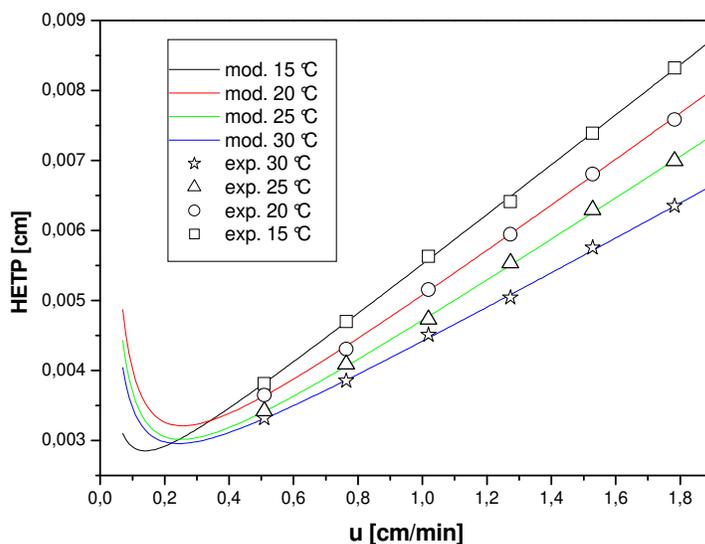


Figura 5.20 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) para o S(-)-mitotano. As linhas contínuas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos (○),(□),(Δ) e (☆) representam os dados obtidos experimentalmente.

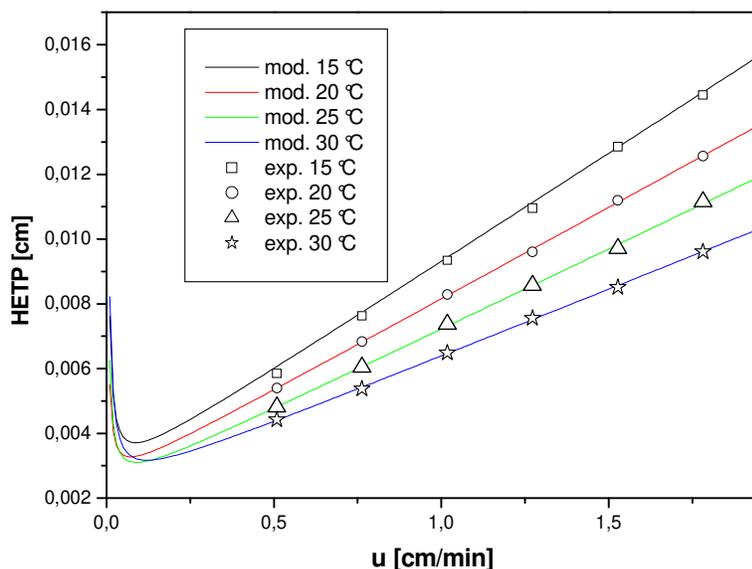


Figura 5.21 – Curvas de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) para o R(+)-mitotano. As linhas contínuas referem-se aos dados obtidos após o ajuste da equação de van Deemter; os símbolos (○),(□),(Δ) e (☆) representam os dados obtidos experimentalmente.

A Tabela 5.16 apresenta os valores dos parâmetros A, B e C obtidos na coluna Chiralpak AD. Pode-se observar que, a variação “A” também foi insignificante com o aumento da temperatura. Essa pequena mudança, talvez, tenha relação com o baixo gradiente de temperatura aplicado neste estudo.

Observando a variação do termo “B” com a temperatura, nota-se que, com o aumento da temperatura este termo aumentou. Como foi acima citado, este resultado era esperado, devido ao aumento da difusão molecular com a temperatura.

Finalmente, foi verificado que o parâmetro “C” obtido na separação dos enantiômeros na coluna Chiralpak AD decresceu com o aumento da temperatura. Este comportamento também era esperado, pois, este parâmetro é inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do soluto nas fases líquida e sólida.

Tabela 5.16 – Coeficientes da curva de van Deemter obtidas na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em varias temperaturas diferentes

Enantiômeros	T (°C)	A	B	C
R (+)	15	$2,55 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5} \pm 1,8 \times 10^{-4}$	$6,71 \times 10^{-3} \pm 2,0 \times 10^{-4}$
	20	$2,45 \times 10^{-3} \pm 3,7 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-4}$
	25	$2,21 \times 10^{-3} \pm 4,9 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-4}$	$4,97 \times 10^{-3} \pm 2,4 \times 10^{-4}$
	30	$2,17 \times 10^{-3} \pm 2,9 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	$4,16 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-4}$
S (-)	15	$1,85 \times 10^{-3} \pm 2,9 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-4}$
	20	$1,49 \times 10^{-3} \pm 2,1 \times 10^{-4}$	$22,0 \times 10^{-5} \pm 0,9 \times 10^{-4}$	$3,37 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-4}$
	25	$1,50 \times 10^{-3} \pm 2,2 \times 10^{-4}$	$19,0 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-4}$	$3,03 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-4}$
	30	$1,72 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-4}$	$15,0 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-4}$	$2,55 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-4}$

A Tabela 5.17 apresenta os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L) e os coeficientes globais de transferência de massa para ambos os enantiômeros. Os resultados determinados para D_L de cada enantiômero do mitotano contradiz a afirmação de Wang e Ching (2002), anteriormente citada. Possivelmente essa diferença observada pode ser atribuída à distinção cinética do processo de adsorção e dessorção do enantiômeros S(-) em relação ao R(+), ou seja, o S(-) ao ser conduzido através da coluna apresenta uma maior velocidade de

escoamento diante o R-(+). Foi observado ainda que o tempo de retenção do S(-) apresentou-se muito próximo do tempo de retenção do traçador, uma vez que houve uma baixa resistência à transferência de massa justificada pelos elevados valores de k_m .

Tabela 5.17 – Valores de D_L e k_m obtidos a partir dos coeficientes da curva de van Deemter na fase estacionária Chiralpak AD com isopropanol/metanol 60:40% (v/v).

Enantiômeros	T (°C)	D_L (cm ² /min)	k_m (min ⁻¹)
S(-)	15	$3,5 \times 10^{-5} + 9,25 \times 10^{-4}u$	114,53
	20	$11,0 \times 10^{-4} + 7,45 \times 10^{-4}u$	122,97
	25	$9,5 \times 10^{-5} + 7,50 \times 10^{-4}u$	130,79
	40	$7,5 \times 10^{-5} + 8,60 \times 10^{-4}u$	146,92
R(+)	15	$2,5 \times 10^{-5} + 12,75 \times 10^{-4}u$	72,18
	20	$1,5 \times 10^{-5} + 12,25 \times 10^{-4}u$	85,80
	25	$2,0 \times 10^{-5} + 11,05 \times 10^{-4}u$	99,65
	40	$3,0 \times 10^{-5} + 10,85 \times 10^{-4}u$	120,11

5.4.5 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção foram determinados nas colunas cromatográficas Lux-Cellulose-2 e Chiralpak AD, através dos gráficos de van't Hoff obtidos das Equações 4.5 e 4.6. Os coeficientes angulares e lineares, dado pela relação linear da curva de van't Hoff, permitiram calcular a entalpia (ΔH_i^0) e a entropia (ΔS_i^0), molar de adsorção do componente i na fase estacionária para ambos os enantiômeros do mitotano. Esta relação foi obtida numa vazão 1 mL/min na coluna analítica Lux Cellulose-2, em duas fases móveis diferentes: (i) hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v), escolhida como a melhor fase móvel; e (ii) hexano puro, utilizada como parâmetro comparativo.

Tabela 5.18 – Parâmetros termodinâmicos dos enantiômeros do mitotano sobre a fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com diferentes fases móveis e os coeficientes de correlação da curva de van't Hoff ($\ln k_i$ versus $1/T$).

Enantiômeros	Fase móvel	ΔH_i^0 (kJ/mol)	ΔS_i^0 (J/mol.K)	Coefficiente de correlação (R^2)
R-(+)-mitotano	Hexano/etanol	-7,194	-25,806	0,9972
	99,9:0,1% (v/v)			
S-(-)-mitotano	Hexano puro	-9,433	-18,758	0,8891
	Hexano/etanol	-7,806	-25,172	0,9957
	99,9:0,1% (v/v)			
	Hexano puro	-9,918	-19,371	0,8958

A Tabela 5.18 apresenta os valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH_i^0 e ΔS_i^0) e seus respectivos coeficientes de correlação, todos obtidos para ambos os enantiômeros em coluna Lux Cellulose-2 com fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v). Verifica-se que para esta fase móvel, as curvas do gráfico de van't Hoff (Figura 5.22 e 5.23) se ajustaram satisfatoriamente a um modelo linear, justificado pelos valores dos coeficientes de correlação obtidos. Através da análise dos resultados, presume-se que a fase estacionária não sofreu modificações em seu arranjo estrutural durante a separação dos enantiômeros nas diferentes temperaturas estudada, ou seja, as interações enantiosseletivas não foram afetadas.

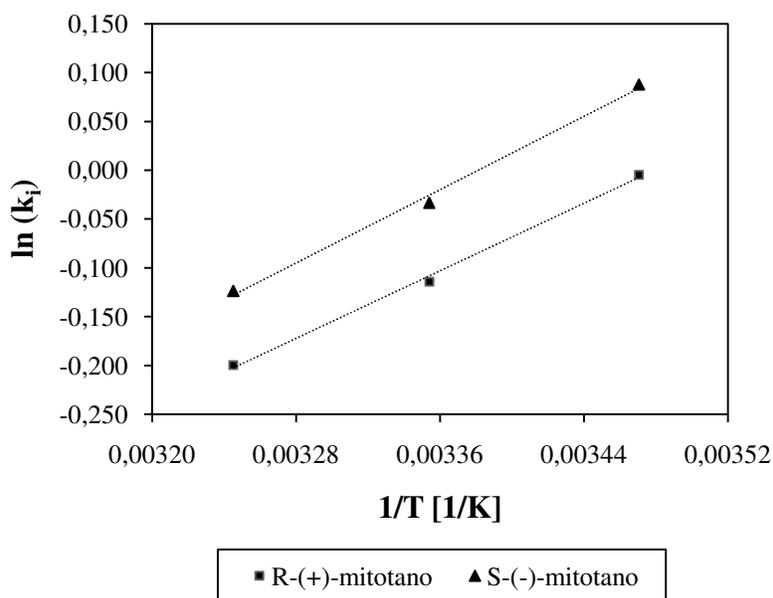


Figura 5.22 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1 (v/v) em função do inverso da temperatura (em Kelvin); Concentração de mitotano = 0,2 g/mL; $Q = 1,00$ mL/min.

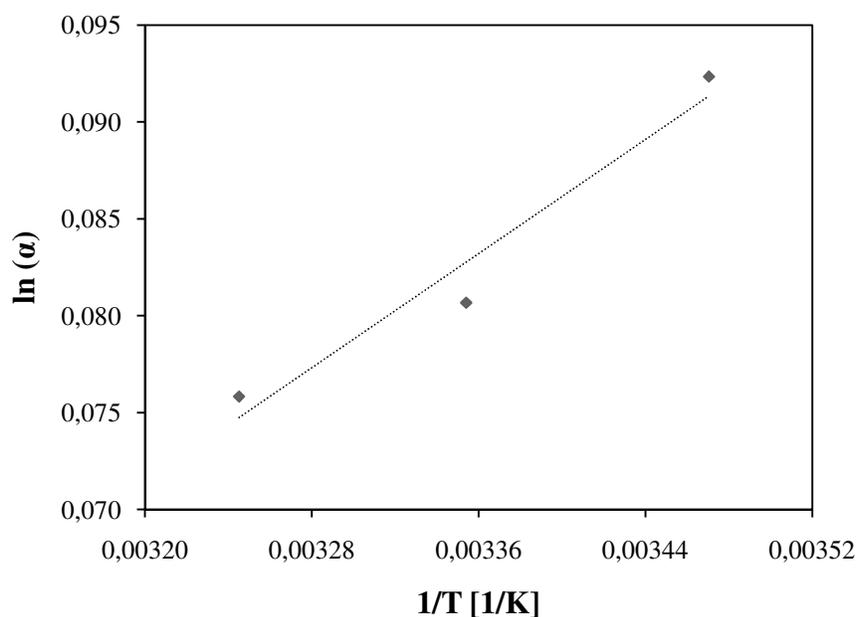


Figura 5.23 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, $Q = 1,00$ mL/min.

Já com relação à fase móvel hexano puro, não se observou o mesmo comportamento. Nota-se, pelo gráfico de van't Hoff (Figura 5.24 e 5.25) que os resultados experimentais não se ajustaram satisfatoriamente ao modelo linear. Uma causa provável dessa falta de ajuste pode ser atribuída ao mecanismo de reconhecimento quiral o qual pode ter sofrido uma variação com o aumento da temperatura ou então, pode ter ocorrido um erro durante os condicionamentos da coluna e da fase móvel nas temperaturas analisadas. Vale ressaltar ainda que, para ambas as fases móveis utilizadas, os parâmetros termodinâmicos (ΔH_i^0 e ΔS_i^0) obtidos indicaram a presença de favorecimento energético entre o fenômeno de adsorção existente entre o soluto (mitotano) e as fases estacionárias. Além disso, constatou-se que para valores negativamente mais acentuados em termos de entalpia, os enantiômeros apresentaram maior tempo de retenção dentro da coluna. Em termos de entropia, os valores mais negativos indicaram maior ordem do sistema cromatográfico e esta ordem foi mais acentuada realizando a separação dos enantiômeros em fase móvel hexano/etanol na coluna Lux Cellulose-2. Os parâmetros termodinâmicos devem ocorrer de forma independente da temperatura para que a separação seja controlada somente por efeitos entálpicos.

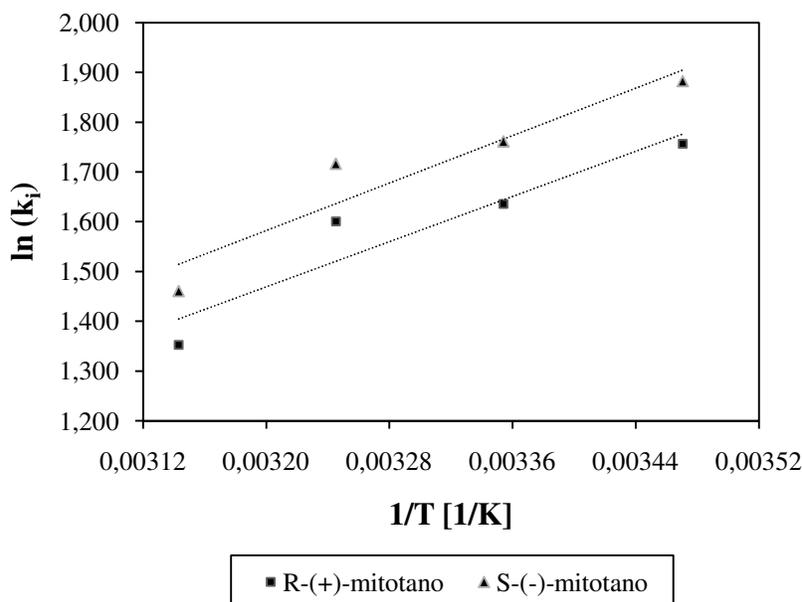


Figura 5.24 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano puro em função do inverso da temperatura (em Kelvin); Concentração de mitotano = 0,2 g/mL; Q = 1,00 mL/min.

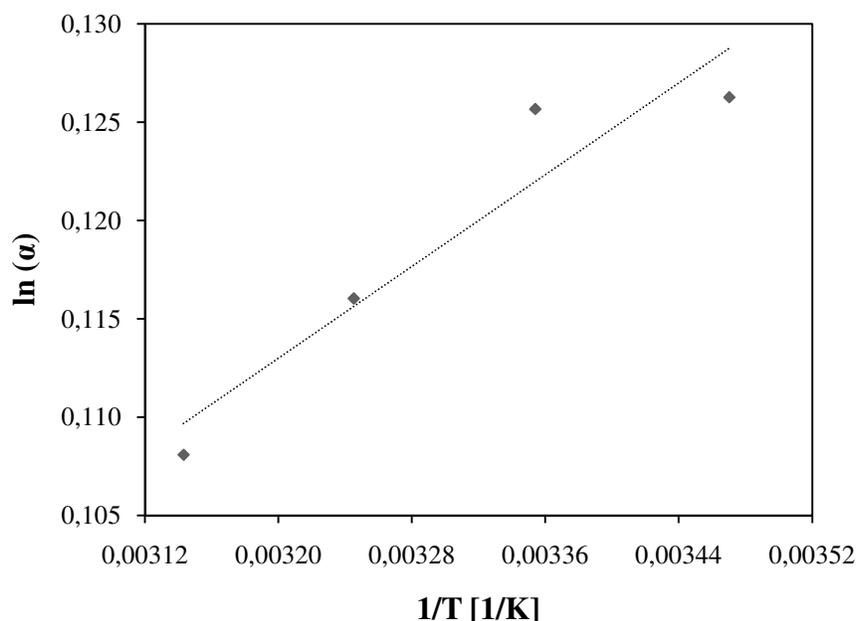


Figura 5.25 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano puro em função do inverso da temperatura em Kelvin, $Q = 1,00$ mL/min.

Tabela 5.19 – Parâmetros termodinâmicos e temperatura enantiosseletiva dos enantiômeros do mitotano sobre fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose com diferentes fases móveis.

Fase móvel	$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	T_{iso} (K)	R^2
Hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v)	-0,612	-1,365	-0,205	448,34	0,9544
Hexano puro	-0,485	-0,613	-0,299	791,75	0,8998

A Tabela 5.19 mostra as diferenças de variação de entalpia ($\Delta\Delta H^\circ$) e entropia ($\Delta\Delta S^\circ$) para um par enantiomérico, das quais os valores com os sinais negativos dos dois parâmetros indicaram a ocorrência da transferência dos enantiômeros do mitotano da fase móvel para a fase estacionária, ou seja, a separação foi dirigida de forma entálpica. Pode-se observar que, o valor da

variação da diferença de energia livre de adsorção ($\Delta\Delta G^\circ$) diminuiu quando foi feita a mudança da fase móvel.

A temperatura isoenantiosseletiva (T_{iso}) determinada de acordo com a Equação 4.8, para as duas fases móveis (hexano puro e hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v)) utilizadas na separação dos enantiômeros do mitotano na coluna Lux Cellulose-2 foram 518,6 e 175,19 °C, respectivamente. Estas temperaturas indicam que a ordem de eluição dos enantiômeros muda. Contudo, é impossível operar o sistema nestas temperaturas, uma vez que a temperatura máxima de trabalho para este tipo de coluna é de apenas 45 °C, e o seu aumento leva a degradação da fase estacionária e do soluto.

A Tabela 5.20 reúne todos os valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH_i^0 ; ΔS_i^0 ; $\Delta\Delta H^\circ$; $\Delta\Delta S^\circ$; $\Delta\Delta G^\circ$ e T_{iso}) e a Tabela 5.21 apresenta os valores dos coeficientes de correlação da curva de van't Hoff ($\ln k_i$ versus $1/T$), todos obtidos para ambos os enantiômeros em coluna Chiralpak AD com fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v). Verifica-se que para esta fase móvel, as curvas do gráfico de van't Hoff (Figura 5.26 e 5.27) se ajustaram satisfatoriamente a um modelo linear, justificado pelos valores dos coeficientes de correlação obtidos. Fazendo-se uma análise análoga à da coluna Lux Cellulose-2, presumisse que a fase estacionária da coluna Chiralpak AD também não sofreu modificações em seu arranjo estrutural durante a separação dos enantiômeros nas diferentes temperaturas estudada, ou seja, as interações enantiosseletivas não foram afetadas. Para esta coluna, a diferença de entalpia para o enantiômero R-(+) mostrou-se o dobro do valor de entalpia de seu enantiômero respectivo, o que garantiu a excelente separação entre eles. Além disso, a diferença entrópica indicou uma maior ordem de transferência do soluto da fase móvel para a fase estacionária.

Tabela 5.20 – Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v).

Enantiômeros	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol.K)	$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	T_{iso} (K)
S-(-)-mitotano	-7,747	-34,329				
R-(+)-mitotano	-14,311	-46,518	-6,563	-12,189	-2,96	538,45

Tabela 5.21 – Coeficientes de correlação da curva de van't Hoff ($\ln k_i$ versus $1/T$) para os enantiômeros do mitotano na coluna Chiralpak AD.

Fase estacionária	Fase móvel	Coeficiente de correlação (R^2)	
		R-(+)-mitotano	S-(-)-mitotano
Chiralpak AD	Isopropanol/metanol 60:40% (v/v)	0,9477	0,9196

A T_{iso} obtida também se encontra muito acima da temperatura máxima de trabalho. Portanto, não foi possível verificar se haveria a inversão da ordem de eluição dos enantiômeros a partir da temperatura destacada na Tabela 5.20.

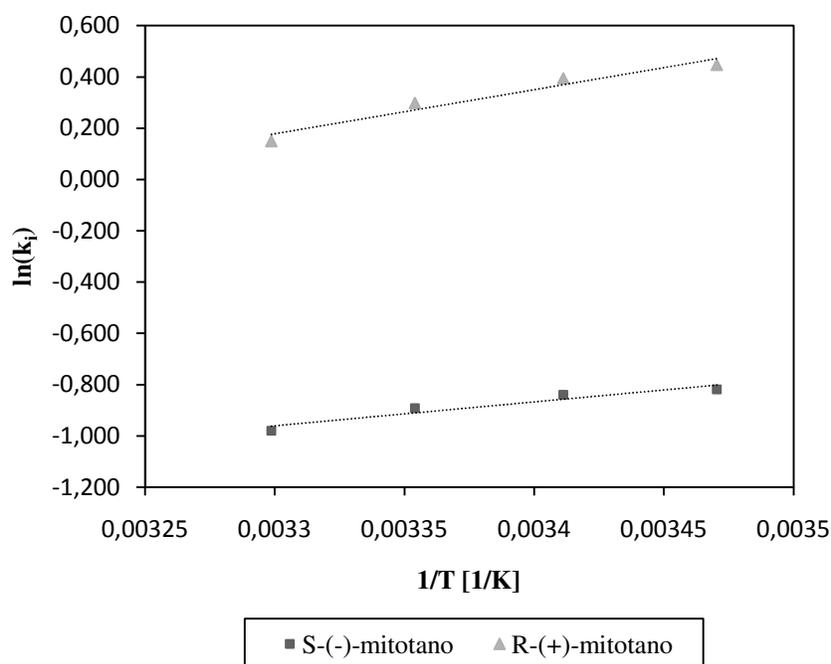


Figura 5.26 – Análise termodinâmica do fator de retenção dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, $Q = 1,00$ mL/min.

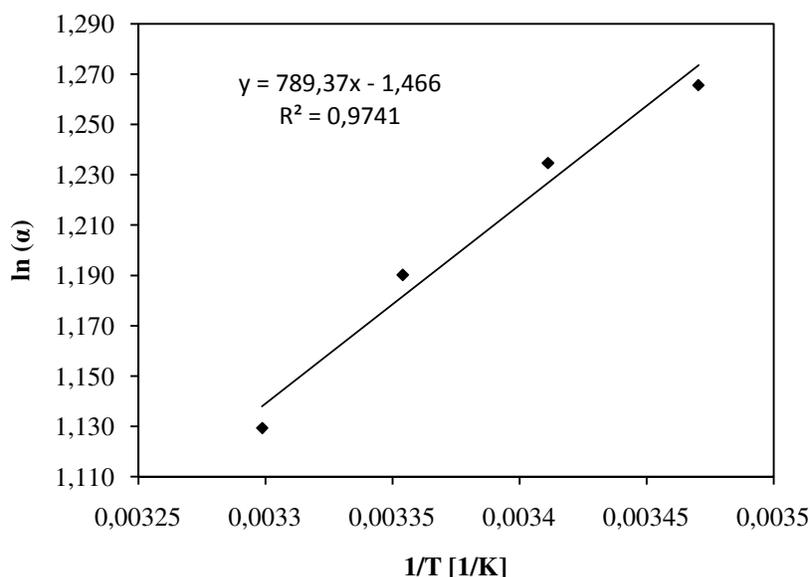


Figura 5.27 – Análise termodinâmica do fator de separação dos enantiômeros mitotano na fase estacionária Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) em função do inverso da temperatura em Kelvin, $Q = 1,00$ mL/min.

5.5 – Experimentos com soluções concentradas

5.5.1 – Determinação das curvas de sobrecargas

A Figura 5.28 apresenta os perfis de eluição de sobrecarga obtidos para diferentes concentrações dos enantiômeros (0,2; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0 e 50 mg/mL) na coluna Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v). Os experimentos foram realizados com injeção de 20 μ L da amostra e com vazão da fase móvel de 1,00 mL/min. O cromatograma dos perfis de sobrecarga demonstra uma redução nos tempos de retenção dos enantiômeros na medida em que se aumenta a concentração da mistura racêmica (Tabela 5.22). Este resultado já era esperado, pois segundo Guiochon et al (1994), 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. Notou-se que a partir da concentração de 2,0 mg/mL um leve sinal de saturação foi apresentado, uma vez que nesta concentração ocorreu o toque das bandas dos picos e, conseqüentemente, a elevação da linha de base entre eles.

Tabela 5.22 – Tempos de retenção a meia altura da frente do pico no estudo da sobrecarga em coluna Lux Cellulose-2.

Concentração injetada (g/L)	Massa total injetada (mg)	Tempos de retenção (min)	
		S-(-)	R-(+)
0,20	0,004	6,89	7,33
2,00	0,04	6,78	7,22
4,00	0,08	6,76	7,20
6,00	0,12	6,58	6,99
10,00	0,20	6,45	6,93
Média ± erro		6,692±0,175	7,134±0,168

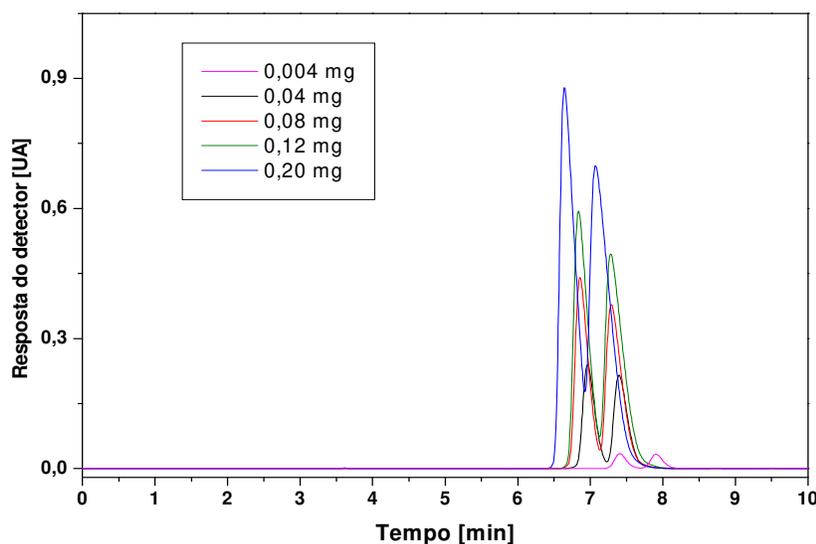


Figura 5.28 – Perfis de eluição de sobrecarga dos enantiômeros do mitotano em diferentes concentrações com injeção de 20 μ L da solução; vazão de 1,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 $^{\circ}$ C.

A Figura 5.29 apresenta os perfis de eluição de sobrecarga obtidos para diferentes volumes de injeção (20; 50; 100; e 200 μL) na coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v). Os experimentos foram realizados com uma solução de mitotano numa concentração de 120 g/L e vazão da fase móvel de 2,00 mL/min.

Tabela 5.23 – Tempos de retenção a meia altura da frente do pico no estudo da sobrecarga em uma coluna Chiralpak AD.

Volume injetado (μL)	Massa total injetada (mg)	Tempos de retenção (min)	
		S-(-)	R-(+)
20	2,40	3,067	4,800
50	6,00	3,058	4,492
100	12,00	3,050	4,225
200	24,00	3,042	3,925
Média \pm erro		3,054 \pm 0,011	4,361 \pm 0,366

A Tabela 5.23 mostra a variação dos tempos de retenção dos enantiômeros, na qual o enantiômero S-(-) possui uma variação nos tempos de retenção insignificante mediante a avaliação dos experimentos de sobrecarga da coluna. Esta condição indica que o primeiro composto possui uma baixa interação com a fase estacionária, visto que, todas as bandas dos picos formadas nas diferentes concentrações são assimétricas e, além disso, para atingir a quantidade máxima de adsorção deste primeiro enantiômero eluído maiores volumes de alimentação são requeridos. Já em relação ao enantiômero R-(+), este apresenta uma maior interação com a fase estacionária devido à formação de uma cauda no processo de dessorção.

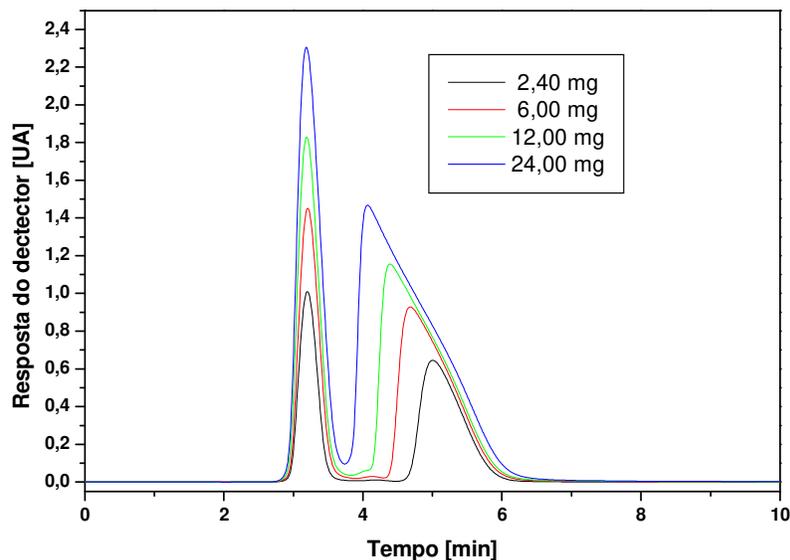


Figura 5.29 – Perfis de eluição de sobrecarga dos enantiômeros do mitotano em diferentes concentrações com injeção de 20 μ L da solução; vazão de 2,0 mL/min; comprimento de onda de 270 nm; e temperatura de 25 $^{\circ}$ C.

5.5.2 - Determinação da isoterma de adsorção

As isotermas de equilíbrio obtidas na coluna Lux Cellulose-2 com a fase móvel hexano/etanol 99,9:0,1% (v/v) para separação dos enantiômeros do mitotano na temperatura de 25 $^{\circ}$ C e vazão de 1,00 mL/min são apresentadas nas Figuras 5.30 e 5.31.

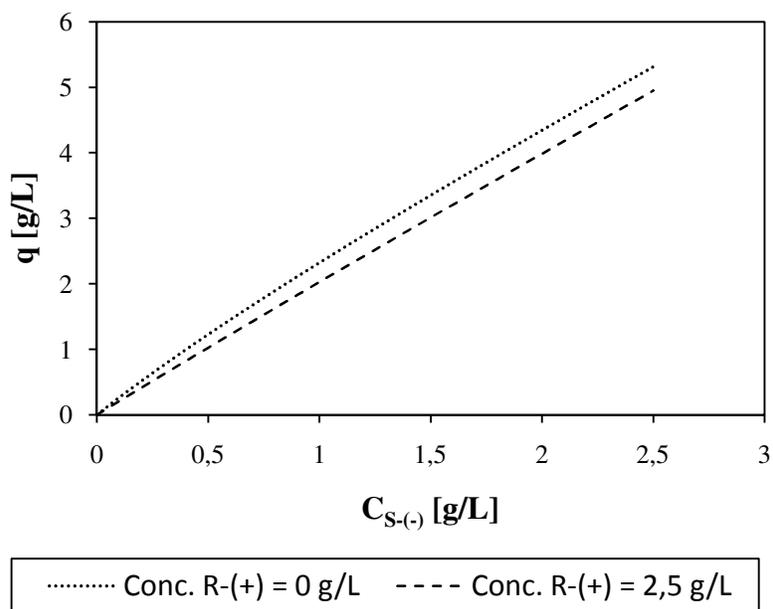


Figura 5.30 – Isotherma de adsorção do enantiômero S-(-)-mitotano em fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.

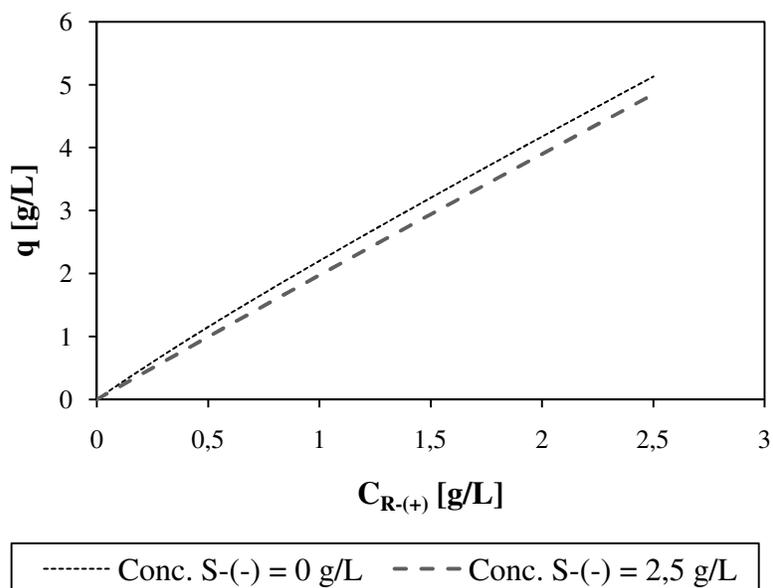


Figura 5.31 – Isotherma de adsorção do enantiômero R-(+)-mitotano em fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.

As seguintes observações podem ser feitas.

O primeiro termo da isoterma Langmuir competitivo modificada, que representa a linearidade da mesma, mostrou-se bem mais significativo que seu termo não-linear, indicando que dentro do estudo da faixa de concentração do enantiômero, a isoterma descreve um comportamento linear em condições quando há a mesma quantidade de ambos enantiômeros na fase móvel. Tal comportamento pode ser explicado devido ao equilíbrio ter sido alcançado em baixas concentrações, uma vez que o fator de retenção obtido é relativamente baixo (mostrado no tópico 5.1). Neste caso os processos de adsorção e dessorção aconteceram de forma muito rápida, o que resultou em baixo tempo de equilíbrio. Isto pode ser comprovado pela baixa resistência à transferência de massa na superfície da partícula determinada no tópico 5.4.4.

Como pode ser observado a partir da Tabela 5.24, as constantes de Henry obtidas também demonstram que a interação dos enantiômeros não foi satisfatória com a fase estacionária, pois a capacidade máxima de adsorção obtida na fase estacionária foi igual a uma unidade. Os parâmetros da isoterma nela apresentada referem-se ao modelo Langmuir competitivo modificado conforme Equação 4.17.

Tabela 5.24 – Parâmetros da isoterma obtidos com o software HELP a partir do modelo Langmuir competitiva modificada.

Enantiômeros	λ_i	$q^*\beta_i$	$q^*(g/L)$	$\beta_i(L/g)$
R-(+)	1,8	0,6737	1	0,6737
S-(-)	1,8	0,8723	1	0,8723

Legenda: constante de adsorção linear para um componente i (λ_i); capacidade máxima de adsorção dos sítios enantiosseletivos (q_i^*); e constante de adsorção não linear do componente i (β_i).

A partir da Tabela 5.24 e a Equação 4.17, as curvas das isotermas de adsorção, Figuras 5.30 e 5.31, que descreve o equilíbrio entre a concentração do soluto na fase líquida com a concentração do soluto na fase sólida para os enantiômeros R e S são:

$$q_R = 1,8 C_R + \frac{0,6737 C_R}{1 + 0,6737 C_R + 0,8723 C_S} \quad (5.1)$$

$$q_S = 1,8 C_S + \frac{0,8723 C_S}{1 + 0,6737 C_R + 0,8723 C_S}$$

As isotermas de equilíbrio obtidas na coluna Chiralpak AD com a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v) para separação dos enantiômeros do mitotano na temperatura de 25 °C e vazão de 1,00 mL/min são apresentadas nas Figuras 5.32.

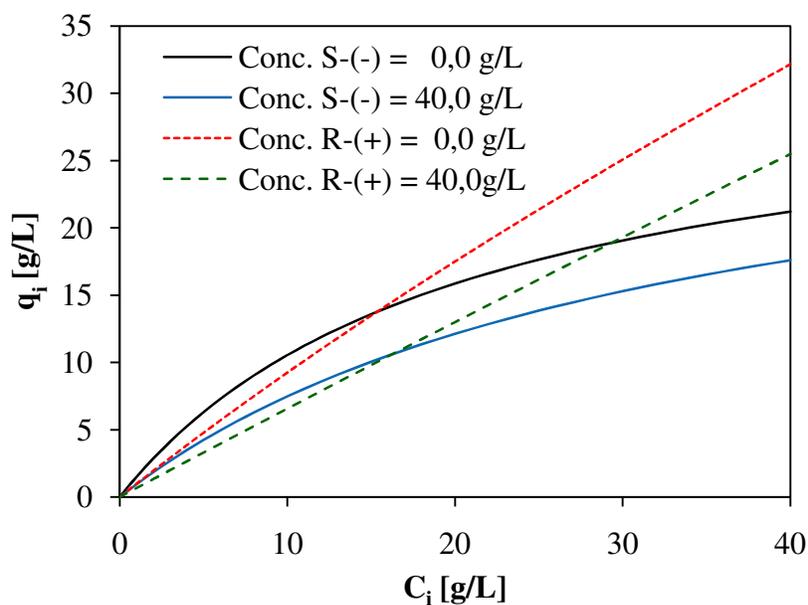


Figura 5.32 – Isoterma de adsorção da mistura racêmica do mitotano em fase estacionária tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose a 25 °C e vazão de 1,00 mL/min obtido com o software HELP®.

Diante da Figura 5.32, acima apresentada, as seguintes observações podem ser feitas.

O primeiro termo da isoterma, que representa a linearidade, mostrou-se bem mais significativo que seu termo não-linear para o enantiômero S-(-), indicando que dentro do estudo da faixa de concentração do enantiômero, a isoterma descreveu um comportamento levemente

linear em condições quando há a mesma quantidade de ambos enantiômeros na fase móvel. Para o enantiômero R-(+) não se observa o mesmo comportamento, pois a curva da isoterma descreve uma forma não-linear, significando que a capacidade de saturação da coluna para esse enantiômero é menor que a do S-(-).

Como pode ser observado a partir da Tabela 5.25, a capacidade de saturação nos sítios enantiosseletivos, para a mistura racêmica, encontra-se entre as capacidades dos seus enantiômeros puros. A Figura 5.32 mostra claramente que a capacidade de adsorção máxima para o enantiômero R-(+) tende para um valor abaixo de 25 g/L, enquanto que, para o enantiômero S-(-) tende para um valor superior a 35 g/L. As curvas das isotermas de adsorção para os enantiômeros Figura 5.32, foram obtidas a partir do método inverso descrito por GUIOCHON *et al.*, (1994), cujo método de cálculo do software HELP[®] está baseado. Portanto as equações obtidas a partir das simulações numéricas foram:

$$q_S = 0,5 C_S + \frac{0,4907 C_S}{1 + 0,4907 C_R + 0,1,574C_S} \quad (5.2)$$

$$q_R = 0,5 C_R + \frac{1,574 C_R}{1 + 0,4907 C_R + 1,574C_S}$$

Tabela 5.25 – Parâmetros da isoterma obtidos com o software HELP a partir do modelo bi-Langmuir competitiva modificada.

Enantiômeros	λ_i	$q^*\beta_i$	$q^*(g/L)$	$\beta_i(L/g)$
S-(-)	0,5	0,4907	32	0,01533
R-(+)	0,5	1,574	32	0,04919

Legenda: constante de adsorção linear para um componente i (λ_i); capacidade máxima de adsorção dos sítios enantiosseletivos (q_i^*); e constante de adsorção não linear do componente i (β_i).

6 - CONCLUSÕES

A presente dissertação oferece uma alternativa para a separação da mistura racêmica do mitotano com duas colunas de cromatografia quiral, conhecidas comercialmente como Lux Cellulose 2 e Chiralpak AD. Através dos resultados pôde-se verificar que a coluna Chiralpak AD mostrou melhor eficiência de separação em relação à Lux Cellulose 2. Essa diferença não pode ser considerada como um parâmetro comparativo entre elas, pois as colunas utilizadas possuem dimensões diferentes, além de uma ser analítica e a outra semi-preparativa. No entanto, a fase móvel adequada para a separação dos enantiômeros do mitotano com a fase estacionária tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose foi hexano/etanol 99,9:0,01% (v/v). Para a fase estacionária tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose foi selecionada a fase móvel isopropanol/metanol 60:40% (v/v). Com o auxílio do dicróismo circular pôde-se verificar que a ordem de eluição dos enantiômeros nas fases estacionárias ocorreu de modo inverso: na coluna Lux Cellulose-2, o enantiômero menos retido tratava-se do R-(+)-mitotano e o mais retido do S-(-)-mitotano, ao passo que, na coluna Chiralpak AD o enantiômero menos e mais retido foram S-(-) e o R-(+), respectivamente.

Os parâmetros cromatográficos obtidos nas duas colunas demonstraram uma satisfatória separação dos enantiômeros do mitotano. Na coluna Lux Cellulose-2 o fator de separação foi 1,07 e a resolução de 1,50, ao passo que, na Chiralpak AD valores de 3,29 e 4,5 foram obtidos para o fator de separação e resolução, respectivamente. Os fatores de separação e resolução indicaram que a coluna Chiralpak AD apresentou uma vantajosa separação em relação à outra coluna utilizada. Os parâmetros de transferência de massa, os quais envolvem os coeficientes globais de transferência de massa (k_m) e os coeficientes de difusão axial (D_L), apresentaram-se bastante adequados na separação dos enantiômeros do mitotano, isto é, os valores determinados para k_m foram relativamente elevados, proporcionando uma baixa resistência à transferência de massa. No entanto, não podemos fazer nenhuma comparação relativa a este efeito, porque não há estudo de separação com colunas na mesma dimensão, tamanho de partículas e fases estacionárias diferentes.

Os efeitos da vazão e da temperatura atuaram diretamente na resolução da separação. Na coluna Lux Cellulose-2 as melhores resoluções foram alcançadas em vazões menores que 0,5

mL/min e temperatura de 25 °C, enquanto que, na coluna Chiralpak AD, à medida que diminuía a vazão a resolução aumentava, sendo neste caso, a melhor eficiência de separação alcançada na temperatura de 20 °C.

Com relação aos parâmetros termodinâmicos, entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, foram comprovadas que nas duas colunas estudadas o processo de separação foi energeticamente favorável à adsorção dos solutos na fase estacionária, devido à energia entálpica ser maior que a energia entrópica.

As isotermas de adsorção obtidas demonstraram que, na coluna Lux Cellulose-2 o primeiro termo da isoterma bi-Langmuir competitiva para os dois enantiômeros foi mais significativo, conclui-se que as maiorias das interações de adsorção estão localizadas nos sítios não seletivos da fase estacionária. Enquanto que, na Chiralpark AD as interações do enantiômero R-(+)-mitotano acontecem nos sítios enantiosseletivos que se pode constatar a partir da formação da curva não-linear da isoterma de adsorção.

6.1 – Sugestões de trabalhos futuros

A partir dos promissores resultados obtidos na separação da mistura racêmica do mitotano por cromatografia líquida de alta eficiência com a fase estacionária tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose, fica registrados sugestões para trabalhos futuros:

- Determinação da isoterma competitiva por outros métodos reportados na literatura, para comprovação das isotermas obtidas mediante o método inverso utilizado pelo software Help®;
- Determinação das isotermas em diferentes temperaturas para avaliação da energia de adsorção dos enantiômeros;
- Separação dos enantiômeros no sistema de cromatografia contínua no leito móvel Varicol®;
- A partir dos enantiômeros puros do mitotano, obtidos pelo sistema de cromatografia contínua Varicol® , determinar as isotermas de adsorção;

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. *Chiral separation techniques*. G. Subramarian, 2007. Cap. 2 Role of polysaccharides in chiral separations by liquid chromatography and capillary electrophoresis, p. 29-97.

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, *Environ Toxicol*, v. 17, p. 329–333, 2002.

ALLINGER, N.D.; CAVA M.P.; DE JONGH D.C.; JOHNSON C.R.; LABEL N.A.; STEVENS C.L. *Química orgánica*, Editorial Reverté S.A. Tradução: JARQUE R.G., ANDREU E.M, OLMO V.S., 1991. Cap. 6: Estereoquímica, p. 141-186.

ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 91, p. 2027–2037, 2006.

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.

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

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.

CANTILLANA T.; ERIKSSON L. (2S)-1,1-Dichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane. *Acta Crystallographica Section E*, v. 65, p. 297, 2009.

CANTILLANA, T.; LINDSTRÖM, V.; ERIKSSON, L.; BRANDT, I.; BERGMAN, Å. Interindividual differences in *o,p'*-DDD enantiomer kinetics examined in Göttingen minipigs. *Chemosphere*, v.76, p. 167-172, 2009.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação, São Carlos,SP: EdUFSCAR, 2001, 49 p.

CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L. S.; CALAFATTI, A.; DEGANI, A. L. G. Discriminação quiral por clae em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. *Química Nova*, v. 20, p. 49-57, 1997.

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.

CHAN, A. S. C. A new route to important chiral drugs. *Chemtech*, v. 23, p. 46-51,1993.

CIRILLI, R.; ALCAROB, S.; FIORAVANTI, R.; SECCI, D.; FIOREA, S.; LA TORREA, F.; ORTUSO, F. Unusually high enantioselectivity in high-performance liquid chromatography using cellulose tris(4-methylbenzoate) as a chiral stationary phase. *Journal Chromatography A*. v.1216, p. 4673–4678, 2009.

COLLINS, H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*, Campinas-SP, Editora Unicamp, 2006, 453p.

DIAS, RAQUEL MACEDO. Separação cromatográfica quiral do *o,p'*-diclorodifenildicloetano (mitotano) em fase estacionária quiral *o,o'* bis [4-terc-butilbenzoil]-*n,n'*-dialil-*l*-tartadiamida. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 134p. Tese (Mestrado).

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.

ELIEL, E. L. Infelicitous stereochemical nomenclature. *Chirality*, v. 9, p. 428-430, 1997

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S.; HOGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, v. 57, p. 365-376, 2001.

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S.; ROTH, B.; FYGE, A.; HOGLUND, P. Stereospecific determination, chiral inversion in-vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, v.7, p.44-52, 1995.

FEDERSEL, H. J. Drug chirality – scale-up, manufacturing, and control. *CHEMTEC*, v. 23, p. 24-33, 1993.

FELINGER, A.; ZHOU, D.; GUIOCHON, G. Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method. *Journal of Chromatography A*, v. 1005, p. 35-49, 2003.

FRANCOTTE, E. Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena. *Journal of Chromatography A*, v. 666, p. 565-601, 1994.

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

GUIOCHON, G. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1126, p. 6–49, 2006.

GUIOCHON, G. SHIRAZI, S.G.; KATTI, A.M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Boston: Academic Press, MA, 1994. 323p.

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

JAMES, E. A. The application of multicomponent adsorption theory to an ionexchange chromatography system for recovery of whey proteins. 1994. Thesis (PhD) – The University of Queensland, Brisbane, Australia.

LAO, W. E GAN, J. Characterization of column hold-up volume with static and dynamic methods on a immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase. *Chromatographia*, v. 67, p. 3-7, 2008.

McCONATHY, J.; OWENS, M. J. Stereochemistry in Drug Action. *Primary Care Companion. J. Clin. Psychiatry*, v. 5, p.70, 2003.

MEHVAR, R.; BROCKS, D. R. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, p. 185-200, 2001.

MIHLBACHLER K.; KACZMARSKI K.; SEIDEL-MORGENSTERN A.; GUIOCHON G., Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 955, p.35-52, 2002.

MIHLBACHLER, K.; DE JESUS, M. A.; KACZMARSKI, K.; SEPANIAK, M. J.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior of the (\pm)-Tröger's base enantiomers in the phase system of a silica-based packing coated with amylose tri(3,5-dimethyl carbamate) and 2-propanol and molecular modeling interpretation. *Journal Chromatography A*, v.1113, p. 148-161, 2006.

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

NICOUD R.M.; SEIDEL-MORGENSTERN A. Adsorption isotherms: experimental determination and application to preparative chromatography. *Isolation & Purification*, v.2, p. 165-200, 1996.

ORLANDO, R. M.; FILHO, N. C.; GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S. Importância farmacêutica de fármacos quirais, v. IV (1), p. 08-14, 2007

PHAN, A. T. Adrenal Cortical Carcinoma. *Hematol Oncol Clin N Am*, v. 21 p. 489–507, 2007.

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

RIBEIRO, R. C.; MICHALKIEWICZ, E. L.; FIGUEIREDO, B. C.; DELACERDA, L.; SANDRINI, F.; PIANOVSKY, M.D.; SAMPAIO, G.; SANDRINI, R. Adrenocortical tumors in children, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 1225-1234, 2000.

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 derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 11, p. 1653-1670, 2004.

ROSA, PAULO CÉSAR PIRES. Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (O, O'-bis(4-terc-butilbenzoi)-N,N'-dialil-L-tartardiamida). Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 116p. Tese (Mestrado).

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

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

SCHTEINGART, D. E. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 1197-1200, 2000.

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.

SILVA JUNIOR, IVANILDO JOSÉ DA. Estudo cinético e de equilíbrio da separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetate de cellulose microcristalina. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 162p. Tese (Mestrado).

SILVA, G. Í. Caracterização de zeólita Y para separação de hidrocarbonetos no Processo de adsorção, Trabalho de monografia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2003.

SOLOMONS, T.W.G. *Química Orgânica I*. Tradução: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1996. *Cap. 5: Estereoquímica: Moléculas Quirais*, p. 184-230.

STINSON S.C. Chiral Drugs. *Chemical & Engineering News*, v. 78, p. 55-78, 2000.

VARDANYAN, R; HRUBY, V. *Synthesis of essential drugs*. 1. ed. Elsevier Science, 2006. p.643.

WAJCHENBERG B. L.; ALBERGARIA PEREIRA M. A.; MEDONCA B. B.; LATRONICO A. C.; CAMPOS CARNEIRO P.; FERREIRA ALVES V. A.; ZERBINI M. C. N., LIBERMAN B.; GOMES G. C.; KIRSCHNER M. A. Adrenocortical carcinoma : Clinical and laboratory observations, *Wiley-Liss*, v. 88, p. 711-736, 2000.

WANG, T; CHEN, Y.W.; VAILAYA, A.J. Enantiomeric separation of some pharmaceutical intermediates and reversal of elution orders by high-performance liquid chromatography using cellulose and amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivatives as stationary phases. *Journal Chromatography A*, v.902, p. 345-355, 2000.

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 and Technology*, v. 37, p. 2567–2586, 2002.

ZABKA, M.; RODRIGUES, A.E. Thermodynamic and kinetic study of adsorption of r,s-a-tetralol enantiomers on the chiral adsorbent Chiralpak AD. *Separation Science and Technology*, v. 42, p. 739–768, 2007.