



WILSON MURILO CORREA DA SILVA FERRARI

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA SEPARAÇÃO DO  
IBUPROFENO RACÊMICO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA  
QUIRAL UTILIZANDO A FASE ESTACIONÁRIA TRIS  
(3,5-DIMETILFENILCARBAMATO) DE CELULOSE**

Campinas  
2014





**UNICAMP**

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

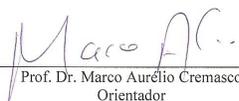
**WILSON MURILO CORREA DA SILVA FERRARI**

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA SEPARAÇÃO DO IBUPROFENO  
RACÊMICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA QUIRAL  
UTILIZANDO A FASE ESTACIONÁRIA  
TRIS (3,5-DIMETILFENILCARBAMATO) DE CELULOSE**

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO WILSON  
MURILO CORREA DA SILVA FERRARI E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO CREMASCO**

  
Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco  
Orientador

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

F412e Ferrari, Wilson Murilo Correa da Silva, 1987-  
Estudo termodinâmico da separação do ibuprofeno racêmico por cromatografia líquida quiral utilizando a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose / Wilson Murilo Correa da Silva Ferrari. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marco Aurélio Cremasco.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ibuprofeno. 2. Enantiômeros. 3. Termodinâmica. 4. Adsorção. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Thermodynamic study of the racemic ibuprofen separation in chiral liquid chromatography using the cellulose tris(3,5 dimethylphenylcarbamate) stationary phase

**Palavras-chave em inglês:**

Ibuprofen

Enantiomer

Thermodynamic

Adsorption

High performance liquid chromatography

**Área de concentração:** Engenharia de Processos

**Titulação:** Mestre em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

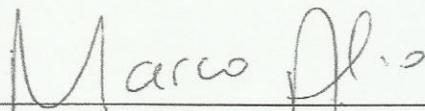
Gustavo Paim Valença

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

**Data de defesa:** 13-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Wilson Murilo Correa da Silva Ferrari e aprovada em 13 de agosto de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco  
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP  
Orientador



---

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzaroto Bresolin  
Departamento de Ciências Exatas e da Terra – Unifesp

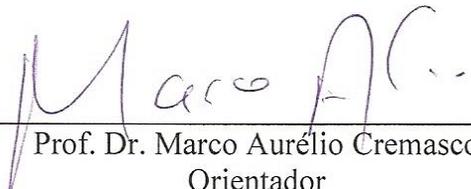


---

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença  
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP



Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendido por Wilson Murilo Correa da Silva Ferrari e aprovada em 13 de agosto de 2014.



---

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco  
Orientador



# Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre ter me dado forças e me guiado, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigado Senhor, por colocar as pessoas certas em meu caminho.

Aos meus pais, Vanderlei e Tânia, por terem me instruído com tanto amor e carinho, sempre me ensinando os verdadeiros valores da vida. A minhas queridas irmãs Ana Caroline e Vitória por fazerem parte de minha vida.

A minha noiva Karoline Deliberali, que tanto amo, por acreditar em meus sonhos e me motivar.

Ao professor Marco Aurélio Cremasco pela oportunidade concedida para a realização do mestrado e por sua orientação.

Aos meus amados parentes de Cascavel que acompanham sempre em meu coração.

Aos meus amigos de laboratório Ana Carolina do Nascimento, Alex Martins, Jean Moreira e Raphael Perna pela valiosa ajuda e pela agradável convivência.

Aos amigos Alan, Carlos, Clairo, Rhelvis, Rodrigo, Sarah, e Sid pelos bons momentos compartilhados nas repúblicas.

Aos meus amigos Elenice, Fernando, Giovana, e Mateus pelo companheirismo.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia química que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, mas não foram mencionados o meu muito obrigado.

*"Aquilo que nós mesmos escolhemos é muito pouco:  
a vida e as circunstâncias fazem quase tudo."*

*Sir John Ronald Reuel Tolkien*

# Resumo

O ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico, conhecido como ibuprofeno, é um importante fármaco anti-inflamatório não esteroidal, também notório por suas propriedades analgésicas e antipiréticas. A droga é comercializada em sua forma racêmica, no entanto em alguns países é empregado apenas o S-(+)-ibuprofeno que detém o princípio ativo. Além disso, o R-(-)-ibuprofeno provoca toxicidade devido à formação de triglicerídeos híbridos no organismo humano. Substâncias que desempenham funções biológicas no corpo necessitam de métodos eficazes de separação e purificação. Os métodos cromatográficos se apresentam como uma alternativa para obter as formas isoladas de enantiômeros com elevado grau de pureza. No presente trabalho, estudou-se estabelecer condições necessárias para a separação eficaz em escala analítica por meio da abordagem termodinâmica do fenômeno. A separação foi realizada com o método direto empregando uma coluna quiral recheada com sílica recoberta por tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. A fase móvel composta por n-hexano e isopropanol na proporção 99/1 foi definida com base nos parâmetros cromatográficos seletividade e resolução. O aditivo ácido trifluoracético também foi utilizado na fase móvel para melhorar a definição dos picos cromatográficos. Após a determinação das fases estacionária e móvel, iniciou-se a caracterização da adsorção envolvida na separação. A ordem de eluição dos enantiômero foi verificada por dicroísmo circular e polarimetria, desta forma constatou-se que o S-(+)-ibuprofeno é o composto mais retido. A porosidade total foi determinada com o método do primeiro momento utilizando o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno, um composto pequeno o suficiente para se difundir tanto entre as partículas do leito quanto em seus interstícios. O valor obtido foi de 0,647. A abordagem do primeiro momento do pulso cromatográfico também possibilitou a determinação da constante de equilíbrio de adsorção para cinco temperaturas entre 15 °C e 35 °C. Neste estudo utilizou-se a porosidade total e o comprimento do leito como parâmetros do método para realizar a linearização do tempo de

retenção *versus* o inverso velocidade da fase móvel. Por fim, os parâmetros entálpicos e entrópicos de adsorção foram calculados por meio da abordagem cromatográfico da equação de van't Hoff. Este equacionamento possibilitou definir o fenômeno como endotérmico, no qual ocorreu adsorção física. O composto mais retido apresentou valor de  $8,76 \text{ kJ mol}^{-1}$  para a variação de entalpia, enquanto o R-(-)-ibuprofeno  $7,21 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A temperatura isoenantiosseletiva calculada foi  $237,38 \text{ K}$ .

# Abstract

The (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl) propanoic acid, known as ibuprofen, is an important non-steroidal anti-inflammatory drug, notorious for its analgesic and antipyretic properties. The drug is commercialized in its racemic form. However in some countries only the S-(+)-ibuprofen is used, which it is the active isomer. Since the R-(-)-ibuprofen is toxic due to forms hybrid triglycerides in the human body. Substances with biological functions in the body must undergo effective methods of separation and purification. Chromatographic methods are an alternative for the separation of enantiomers with high purity. In the present study the necessary conditions for effective separation in analytical scale by means of thermodynamic approach of the phenomenon was studied. The separation was carried out employing a chiral column packed with silica coated with cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate). The mobile phase consisting of n-hexane and isopropanol in ratio 99/1 was defined on the basis in chromatographic parameters as selectivity and resolution. The trifluoroacetic acid additive also was used on the mobile phase to improve the resolution of the chromatographic peaks. After the determination of stationary and mobile phases, the characterization the adsorption involved in the separation was studied. The order of elution of the enantiomers was checked by circular dichroism and polarimetry. It was observed that the S-(+)-ibuprofen is the most retained compound. The total porosity was determined by first moment using 1,3,5-tri-tert-butylbenzene. This molecule is small enough to diffuse through the bed particles, but also the between the particles interstices. The value obtained was 0,647. The approach of first moment of the chromatographic pulse also allowed the determination of the adsorption equilibrium constant for five temperatures between 15 °C and 35 °C. In this study, the bed void and bed length were used as input parameters in the perform linearization of retention time versus the mobile phase inverse velocity. Finally, the enthalpy and entropy of adsorption were calculated by means of chromatographic approach usual the van't Hoff equation. The adsorptions of enantiomers

were endothermic. Both molecules adsorbed physically. The enthalpy of the most retained compound was  $8,76 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $7,21 \text{ kJ mol}^{-1}$  for R-(-)-ibuprofeno. The enantioselective temperature was  $237,38 \text{ K}$ .



# Sumário

Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
Lista de Figuras .....	xix
Lista de Tabelas .....	xxii
Nomenclatura.....	xxiv
Letras Latinas .....	xxiv
Letras Gregas .....	xxvi
Abreviações .....	xxvi
1. Introdução.....	1
1.1 Definição do problema.....	1
1.2 Motivação do trabalho .....	3
1.3 Objetivos .....	5
1.3.1 Objetivo central .....	5
1.3.2 Objetivos específicos .....	5
2. Revisão bibliográfica .....	7
2.1 Ibuprofeno.....	7
2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	8
2.2.1 Cromatografia líquida quiral .....	10
2.2.2 Fase estacionária quiral .....	12
2.2.3 Fase móvel.....	15
2.3 Parâmetros cromatográficos.....	15
2.3.1 Fator de retenção .....	17

2.3.2	Seletividade .....	18
2.3.3	Número de pratos teóricos.....	19
2.3.4	Resolução .....	20
2.4	Termodinâmica de adsorção .....	21
2.4.1	Parâmetros termodinâmicos .....	21
2.4.2	Modelos de isoterma de adsorção.....	30
2.4.3	Constante de equilíbrio de adsorção linear pela análise do primeiro momento do pulso cromatográfico .....	33
2.5	Obtenção das porosidades por meio da análise do primeiro momento.....	35
3.	Materiais e métodos.....	39
3.1	Materiais .....	39
3.1.1	Ibuprofeno padrão e composto inerte .....	39
3.1.2	Solventes orgânicos .....	40
3.1.3	Fase estacionária.....	40
3.1.4	Equipamentos .....	40
3.2	Métodos .....	42
3.2.1	Definição da fase móvel .....	42
3.2.2	Ordem de eluição dos componentes da mistura racêmica.....	42
3.2.3	Determinação da porosidade total .....	43
3.2.4	Determinação dos parâmetros cromatográficos .....	44
3.2.5	Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	44
3.2.6	Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção linear .....	45
4.	Resultados e discussão .....	47
4.1	Testes preliminares .....	47

4.1.1	Coluna OD 20 $\mu\text{m}$ .....	47
4.1.2	Coluna OD 5 $\mu\text{m}$ .....	50
4.2	Verificação da ordem eluição .....	52
4.3	Determinação da porosidade total e razão entre fases móvel e estacionária .....	54
4.4	Determinação dos parâmetros termodinâmicos .....	56
4.5	Determinação da constante de equilíbrio de adsorção linear.....	60
5.	Conclusões.....	66
	Referência Bibliografia.....	69
	Apêndice A.....	82

# Lista de Figuras

- Figura 1.1** – Os enantiômeros do ibuprofeno. 4
- Figura 2.1** – Esquema de um sistema básico de cromatografia líquida de alta eficiência. 9
- Figura 2.2** – Representação esquema do reconhecimento quiral (adaptado de EASSON e STEDMAN, 1933). 11
- Figura 2.3** – FEQ baseadas em polissacarídeos derivados de celulose e amilase (adaptado de LOURENÇO *et al.*, 2010). 13
- Figura 2.4** – Cromatograma teórico para determinar os parâmetros cromatográficos (adaptado de SCHULTE e ERRPPING, 2005). 16
- Figura 2.5** – Perfil da isoterma de adsorção linear e de Langmuir para um composto (adaptado de SCHULTE e EPPING, 2005). 31
- Figura 3.1** – Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB). 39
- Figura 3.2** – Estrutura química da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (adaptado de da SILVA JR *et al.*, 2006). 40
- Figura 3.3** – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (adaptado de MOREIRA, 2013). 41
- Figura 4.1** – Separação de ibuprofeno racêmico na coluna OD 20  $\mu\text{m}$ . Injeções de 20  $\mu\text{L}$  da solução de 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de ibuprofeno para três fases móveis distintas na temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . 48

<b>Figura 4.2</b> – Cromatogramas para injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L <sup>-1</sup> de ibuprofeno racêmico em 5 temperaturas distintas na coluna OD 20 µm. Injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L <sup>-1</sup> de ibuprofeno para diferentes temperaturas e vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> .	49
<b>Figura 4.3</b> – Separação de ibuprofeno racêmico na coluna OD 5 µm. Injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L <sup>-1</sup> de ibuprofeno para duas fases móveis distintas na temperatura de 35 °C e vazão de 1 mL min <sup>-1</sup>	51
<b>Figura 4.4.</b> – Cromatograma da separação de ibuprofeno racêmico (25 °C): (A) UV-Vis e (B) dicroísmo circular.	53
<b>Figura 4.5.</b> – Injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L <sup>-1</sup> de TTBB para determinação da porosidade total. Temperatura de 35 °C e vazão de 0,8 mL min <sup>-1</sup>	54
<b>Figura 4.6</b> – Determinação da porosidade total utilizando o primeiro momento do pulso cromatográfico.	55
<b>Figura 4.7</b> – Cromatogramas da análise de van't Hoff. Injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L <sup>-1</sup> de ibuprofeno nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C. Vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> .	56
<b>Figura 4.8</b> – Gráfico de van't Hoff em função do fator de retenção e temperatura.	57
<b>Figura 4.9</b> – Gráfica de van't Hoff em função da seletividade e da temperatura.	59
<b>Figura 4.10</b> – Cromatogramas da análise do primeiro momento para diferentes vazões. Injeções de 20 µL da solução de 0,15 g L <sup>-1</sup> de ibuprofeno na temperatura de 25 °C.	60
<b>Figura 4.11</b> – Análise do primeiro momento para a temperatura de 15 °C.	61
<b>Figura 4.12</b> – Análise do primeiro momento para a temperatura de 20 °C.	62

<b>Figura 4.13</b> – Análise do primeiro momento para a temperatura de 25 °C.	62
<b>Figura 4.14</b> – Análise do primeiro momento para a temperatura de 30 °C.	63
<b>Figura 4.15</b> – Análise do primeiro momento para a temperatura de 35 °C.	63
<b>Figura A1</b> – Curva de calibração do R-(-)-ibuprofeno.	82
<b>Figura A2</b> – Curva de calibração do S-(+)-ibuprofeno.	83

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Seletores quirais e principais interações com analitos quirais (LOURENÇO <i>et al.</i> , 2010).	13
<b>Tabela 2.2</b> – Fase estacionária, fase móvel, variação de entropia e variação de entalpia da separação de enantiômeros.	26
<b>Tabela 2.3</b> – Enantiômeros e parâmetros termodinâmicos.	29
<b>Tabela 4.1</b> – Colunas com partículas recobertas com tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose utilizadas na separação do ibuprofeno.	47
<b>Tabela 4.2</b> – Parâmetros cromatográficos para a separação de ibuprofeno racêmico em coluna OD 20 $\mu\text{m}$ .	48
<b>Tabela 4.3</b> – Seletividade e resolução da separação de ibuprofeno racêmico para diferentes temperaturas.	50
<b>Tabela 4.4</b> – Parâmetros cromatográficos para a separação de ibuprofeno racêmico em coluna OD 5 $\mu\text{m}$ .	51
<b>Tabela 4.5</b> – Dados para o cálculo da porosidade da Coluna OD 5 $\mu\text{m}$ .	55
<b>Tabela 4.6</b> – Parâmetros termodinâmicos de adsorção do ibuprofeno racêmico na coluna OD 5 $\mu\text{m}$ .	57
<b>Tabela 4.7</b> – Parâmetros termodinâmicos da separação de adsorção ibuprofeno racêmico na coluna OD 5 $\mu\text{m}$ .	59

<b>Tabela 4.8</b> – Valores dos tempos de retenção corrido pelo tempo da planta em diferentes velocidades e temperaturas.	61
<b>Tabela 4.9</b> – Valores das constantes modificadas de Henry para as temperaturas estudadas.	64
<b>Tabela A1</b> – Coeficiente angular da curva de calibração.	83

# Nomenclatura

## Letras Latinas

$a_{ad}$	Atividade da espécie $i$ adsorvida na fase estacionária
$a_{aq}$	Atividade da espécie $i$ em solução na fase móvel
$b_i$	Parâmetro da isoterma de adsorção do componente $i$
$c$	Concentração do componente na fase líquida ( $\text{g L}^{-1}$ )
$d_p$	Diâmetro da partícula (cm)
$h$	Parâmetro linear da isoterma de Langmuir Competitivo Modificado
$k_i$	Fator de retenção
$K$	Constante de equilíbrio de adsorção
$L$	Comprimento da coluna (cm)
$M_n$	N-ésimo momento do perfil de banda na saída do leito
$N$	Número de pratos teóricos
$n_m$	Massa de soluto na fase móvel (g)
$n_s$	Massa de soluto na fase estacionária (g)
$q$	Concentração do soluto na fase estacionária ( $\text{g L}^{-1}$ )
$Q$	Vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )
$q_{sat}$	Capacidade de saturação do adsorvente ( $\text{g L}^{-1}$ )
$R$	Constante universal dos gases ideais ( $8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )
$R_s$	Resolução

$t$	Tempo (min)
$t_{inj}$	Tempo de injeção (min)
$t_M$	Tempo morto (min)
$t_{plan}$	Tempo da planta (min)
$t'_R$	Tempo de retenção do corrigido (min)
$t_R$	Tempo de retenção do componente (min)
$T$	Temperatura (°C, K)
$T_{iso}$	Temperatura de isoenantiosseletividade (K)
$u$	Velocidade intersticial da fase móvel (cm min <sup>-1</sup> )
$v$	Velocidade superficial da fase móvel (cm min <sup>-1</sup> )
$V_C$	Volume da coluna (L)
$V_{int}$	Volume interno da coluna (L)
$V_m$	Volume da fase móvel (L)
$V_p$	Volume da partícula (L)
$V_s$	Volume da fase estacionária (L)
$w_{h/2}$	Largura dos picos a meia-altura (cm)
$\Delta G^0$	Varição da energia de Gibbs (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta H^0$	Varição de entalpia molar de adsorção (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta S^*$	Varição de entropia com termo razão entre fases embutido (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
$\Delta S^0$	Varição de entropia molar de adsorção (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
$\Delta\Delta G^0$	Varição da variação de energia de Gibbs (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta\Delta H^0$	Varição da variação de entalpia de adsorção (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta\Delta S^0$	Varição da variação de entropia de adsorção (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )

## Letras Gregas

$\alpha$	Seletividade
$\varepsilon$	Porosidade do leito
$\varepsilon_p$	Porosidade da partícula
$\varepsilon_T$	Porosidade total do leito
$\lambda$	Comprimento de onda (nm)
$\mu_{(ad)}^0$	Potencial químico padrão na fase estacionária
$\mu_{(aq)}^0$	Potencial químico padrão na fase móvel
$\mu_1$	Primeiro momento
$\bar{\mu}_n$	N-ésimo momento na forma central
$\mu_n$	N-ésimo momento na forma absoluta
$\gamma_{ad}$	Coefficiente de atividade do soluto na fase estacionária
$\gamma_{aq}$	Coefficiente de atividade do soluto na fase móvel
$\nu$	Parâmetro da isoterma de Tóth
$\phi$	Razão entre fases

## Abreviações

AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AD	Nome comercial da fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DEA	Dietilamina
EUA	Estados Unidos da América

EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase estacionária
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
LMS	Leito móvel simulado
OD	Nome comercial da fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose
TEA	Trietilamina
TFA	Ácidos trifluoroacético
TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
UV-Vis	Ultravioleta- visível

## 1. Introdução

---

### 1.1 Definição do problema

A importância da estereoquímica de compostos é bem estudada desde que Louis Pasteur descobriu o fenômeno da quiralidade em 1848. O reconhecimento quiral e a distinção entre os enantiômeros são fenômenos fundamentais em sistemas naturais e químicos, como por exemplo, no estudo de compostos bioativos e poluentes, na descoberta de drogas, no desenvolvimento de agroquímicos, aditivos alimentares e aromas. Todavia, o desenvolvimento mais significativo em tecnologia quiral foi estimulado pela descoberta de novos medicamentos na indústria farmacêutica, onde a maioria dos fármacos desenvolvidos são quirais e os enantiômeros individuais de tais espécies geralmente exibem perfis farmacológicos distintos, tanto na farmacodinâmica quanto na farmacocinética (LÄMMERHOFER, 2010). No cenário mundial, cerca de 60% dos 200 fármacos mais importantes são de natureza quiral. Estes fármacos são anti-inflamatórios, antivirais, anticancerígenos, anticolinérgicos, antibióticos, antidiabéticos, antigástricos, antidepressivos, antissedativos, antiepilépticos, cardiovasculares, reguladores de lipídeos, esteroides, bloqueadores dos canais de cálcio, analgésicos e análogos de ácido fólico (ALI *et al.*, 2013).

O fármaco enantiomérico pode ser identificado por meio do reconhecimento de estruturas tetraédricas centrais, no qual se ligam a quatro compostos distintos e que não possuam um plano simétrico em sua imagem espelhada. Átomos como enxofre, fósforo e nitrogênio formam átomos centrais, contudo a formação mais comum de centros quirais é através do átomo de carbono. Esta característica espacial, devido ao centro quiral em um

fármaco, pode favorecer que uma molécula do par enantiomérico antagonize a ação de seu estereoisômero ou, ainda, um dos enantiômeros pode apresentar um efeito terapêutico, enquanto seu par pode ser responsável por um efeito secundário. Além disso, também há a possibilidade dos dois apresentarem a mesma atividade, mas apenas um manifeste algum tipo de efeito indesejado, dentre outras consequências não menos importantes (LIMA, 1997; CORDATO *et al.*, 2003). Um exemplo clássico destes efeitos foi observado no final da década de 50 e início de 60 na Alemanha e Inglaterra, em que milhares de crianças apresentaram graves deformações congênitas ocasionadas pela utilização da talidomida racêmica em gestantes (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

No que se refere ao uso de compostos quirais em formulações de medicamentos, autoridades regulamentadoras têm estabelecido exigências acerca do assunto. Para demonstrar esta situação, pode-se citar o fato de que o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) exigem o desenvolvimento de estudos de cada um dos pares enantioméricos para avaliar se os enantiômeros diferem na sua ação farmacológica ou perfil toxicológico (SCRIBA, 2013). A âmbito nacional, o controle e legislação vigentes são regulamentados pela ANVISA por meio da RE n°896 e RDC n°135 ambas de 29 de maio de 2003.

As exigências realizadas por parte das autoridades almejam reduzir os gastos com saúde, inclusive com medicamentos, e assegurar o acesso geral da população aos tratamentos de forma racional. Logo, é necessário investimentos em inovações tecnológicas de produtos e/ou processos para favorecer cada vez mais o setor industrial farmacêutico. Neste caso, desenvolver métodos que viabilizem o comércio de enantiômeros puros é um interessante alvo de estudos (CREMASCO, 2013). São várias as vantagens em se comercializar os enantiômeros em sua forma pura e não na forma racêmica, entre elas pode-se citar: redução da dose e da carga no metabolismo; restrições menos rígidas na dosagem, ampliação do uso do fármaco; melhor controle da cinética da dosagem; redução da variabilidade da resposta dos pacientes; maior confiança na padronização da dosagem; redução nas interações com outros fármacos de uso comum; aumento de atividade, aumento de especificidade e redução de efeitos colaterais (CREMASCO, 2013).

O enantiômero puro pode ser obtido basicamente de duas maneiras: por síntese enantiosseletiva ou por separação do racemato. A síntese assimétrica pode ser utilizada no

preparo de grandes quantidades de material. Entretanto, o tempo requerido no processo muitas vezes o torna uma estratégia não atraente. A separação da mistura racêmica, tanto em escala analítica quanto preparativa, é o modo mais empregado, com destaque para a cromatografia líquida de alta eficiência de fase quiral. Esta técnica é capaz de obter ambos os enantiômeros puros (R e S) praticamente isentos de outros compostos, além de ser uma técnica relativamente simples de se aplicar quando o sistema de separação já está definido (CASS *et al.*, 1997; ANDERSON e ALLENMARK, 2002).

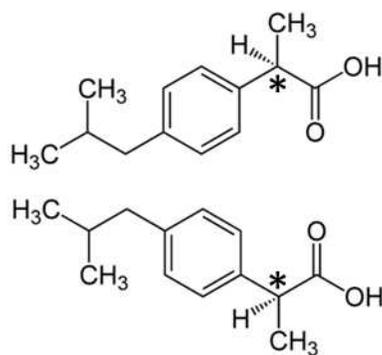
## 1.2 Motivação do trabalho

O mercado brasileiro farmacêutico vivencia uma trajetória de ascensão no ranking global dos maiores mercados farmacêuticos. O país em 2005 ocupava a décima posição, cinco anos depois já ocupava a sétima posição e segundo a previsão em 2015 ocupará o sexto lugar. O Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos de São Paulo (Sindusfarma) aponta que encerrou o ano de 2011 com vendas de cerca de R\$ 43 bilhões, considerando apenas o canal de farmácia. No período 2003-2011 o mercado teve taxa de crescimento médio anual ponderado de 14,3% para as vendas em reais e de 8,5% em unidades vendidas (PALMEIRA FILHO *et al.*, 2012).

Dentre as drogas mais comercializadas uma classe terapêutica importante, tanto pelo elevado consumo quanto pela relevância clínica, são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Estas substâncias pertencem ao grupo aril ou heteroarilcarboxílicos e os principais representantes são os derivados do ácido arilpropiónico como, por exemplo, fenbufeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, indoprofeno, cetoprofeno e ibuprofeno (BARREIRO *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2006).

O ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanóico conhecido como ibuprofeno é um ácido fraco e sua estrutura molecular é enantiomérica em virtude da presença de um átomo quiral na lateral da cadeia do ácido arilpropiónico. O isômero S-(+) é o principal inibidor da produção de prostaglandina e de eventos inflamatórios. A forma R-(-) pode ser usada como bloco quiral na síntese do ácido  $\gamma$ -amino  $\beta$ -hidroxibutírico, medicamento usado no tratamento da hipertensão (COSTA *et al.*, 2006; MACHADO, 2011).

O ibuprofeno é normalmente comercializado em sua forma racêmica, com exceção de alguns países como a Suíça e a Áustria (VALDERRAMA e POPPI, 2011). O tratamento com S-(+)-ibuprofeno exerce melhores efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, e reduz o dano gástrico em comparação com o ibuprofeno racêmico em seres humanos. O R-(-)-ibuprofeno exibe ação farmacológica apenas após a conversão em S-(+)-ibuprofeno. Esta inversão quiral, quando ocorre dentro do corpo humano, pode gerar dois resultados negativos. O primeiro é que a inversão quiral atribui propriedades complexas para a farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco. Desta forma, a determinação da dose correta de ibuprofeno racêmico e formulação indicada para cada tipo de indivíduo e situação se torna difícil. O segundo é que pode provocar toxicidade, tais como a formação de triglicerídeos híbridos (YOON *et al.*, 2008). A estrutura do ibuprofeno é apresentada na Figura (1.1).



**Figura 1.1** – Os enantiômeros do ibuprofeno.

De acordo com o cenário apresentado, nota-se a necessidade de desenvolver uma técnica de separação e purificação para que o fármaco seja comercializado enantiomericamente separado. Além disso, na utilização de drogas é necessário empregar produtos que sejam isentos de contaminantes. A alternativa estudada neste trabalho está baseada na cromatografia líquida de alta eficiência em fase quiral. O intuito em questão é avaliar termodinamicamente a separação e purificação do S-(+)-ibuprofeno e do R-(-)-ibuprofeno com uma coluna cromatográfica analítica quiral recheada com tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, visando futura ampliação de escala para a produção dos enantiômeros puros.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo central

O presente estudo tem como objetivo avaliar a viabilidade termodinâmica de separação da mistura racêmica de ibuprofeno por meio da cromatografia líquida e analisar as respostas termodinâmicas do fenômeno.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Para que se atinja o objetivo central desta Dissertação de Mestrado foram estipulados os seguintes objetivos específicos:

- estabelecer a fase móvel e fase estacionária através de informações da literatura e ensaios experimentais avaliando os parâmetros cromatográficos seletividade, resolução e número de pratos;
- verificar a ordem de eluição dos enantiômeros por meio de análises de dicroísmo circular e polarimetria;
- obter a porosidade total da coluna cromatográfica com a abordagem do primeiro momento do pulso cromatográfico;
- calcular a razão entre fases da coluna utilizando a porosidade total
- caracterizar os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$ ,  $\Delta\Delta H^0$ ,  $\Delta\Delta S^0$  e  $T_{iso}$  utilizando a abordagem cromatográfica de van't Hoff;
- definir as constantes de equilíbrio termodinâmico de adsorção para as temperaturas 15 °C; 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C empregando a análise primeiro momento de um pulso cromatográfico.



## 2. Revisão bibliográfica

---

### 2.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno possui massa molar  $206,29 \text{ g mol}^{-1}$ , é um composto que se apresenta em forma de pó cristalino, branco ou quase branco e de odor característico. Este fármaco possui ponto de fusão entre  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $78 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e é praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em acetato de etila e solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos (ANVISA, 2010).

O ibuprofeno é um fármaco quiral com propriedade de anti-inflamatório não esteroideal (AINE). Foi introduzido no comércio pela vez em 1969 no Reino Unido e, após 5 anos, nos Estados Unidos. A comercialização deste fármaco foi alavancada para substituir outros fármacos AINEs que provocavam irritação gastrointestinal e intolerância no organismo. O ibuprofeno é um AINE quiral que possui propriedades anti-inflamatórias moderadas, com efeitos adversos gastrointestinais mais suaves que outros AINEs. O fármaco possui propriedades analgésicas e antipiréticas, provavelmente relacionados à sua propriedade de anti-inflamatório. O fármaco é eficaz não só em inflamação amena, mas também em doenças inflamatórias graves, tais como artrite reumatoide e osteoartrite, e além de ser eficaz na espondilite anquilosante, gota e síndrome de Bartter (de PALMA, 2009).

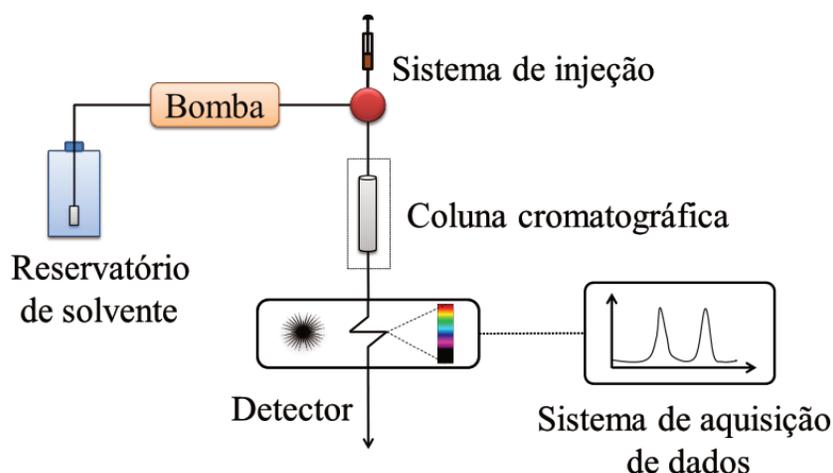
A droga é administrada por via oral, em que após 30 minutos, aproximadamente, é absorvida pelo sistema gastrointestinal. Seu pico de concentração máxima no sangue ocorre em torno de 2 até 4 horas após a ingestão, sendo de  $23 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  para uma dose de 400 mg e de  $56 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $66 \mu\text{g mL}^{-1}$  para 800 mg (de SOUZA, 2008).

O ibuprofeno é normalmente administrado em sua forma racêmica, exceto na Suíça e Áustria. O isômero biologicamente ativo que age contra a inflamação é o S-(+)-ibuprofeno. O R-(-)-ibuprofeno é inativo, porém pode ser convertido em sua forma ativa quando administrado no organismo humano. Há estudos que demonstram que a forma inativa apresenta toxicidade devido ao seu armazenamento no tecido adiposo como um éster de glicerol híbrido (WILLIAMS *et al.*, 1986; FIGUEIREDO, 2012). Como já mencionado, o R-(-)-ibuprofeno pode ser usado como bloco quiral na síntese do ácido  $\gamma$ -amino  $\beta$ -hidroxibutírico, que é utilizado no tratamento de hipertensão (MACHADO, 2011).

## 2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação e quantificação de compostos. 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 fases torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Devido à vasta gama de configurações existentes a cromatografia é classificada de acordo com certos critérios, como por exemplo: a forma espacial da fase estacionária (planar, coluna ou capilar), estado físico da fase estacionária e/ou da fase móvel, polaridade de ambas as fases, método de introdução de amostra, mecanismo de separação, entre outros critérios (DEGANI *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método de destaque entre as modalidades cromatográficas, na qual consiste em eluir solutos presentes em solvente líquido, denominado de fase móvel, sob alta pressão através de uma coluna no qual seu recheio é constituído por algum material adsorvente feito a sílica gel (JARDIM *et al.*, 2006). Os elementos básicos da CLAE são: reservatório de solvente, tubulação equipada com filtros, bomba de alta pressão, dispositivo de injeção de amostra, detector, gravador de dados e coluna cromatográfica. A aquisição de dados é desempenhada por um computador que também pode auxiliar no controle do processo (MEYER, 2004). A Figura 2.1 ilustra um sistema básico de CLAE.



**Figura 2.1** – Esquema de um sistema básico de cromatografia líquida de alta eficiência.

Os instrumentos utilizados em CLAE normalmente são modulares, o que torna possível montar o cromatógrafo com diferentes equipamentos de acordo com a necessidade do usuário. O detector é um dos principais equipamentos alterado em cromatografia visto a variabilidade do princípio de funcionamento e sua sensibilidade de acordo com a sistema empregado. Além disso, detectores em série podem ser utilizados nas situações em que os analitos possuem propriedades físico-químicas muito similares, ou princípio de detecção diferente, a fim de assegurar a identificação ou quantificação dos componentes de interesse. Uma das detecções mais empregada em CLAE é realizada por absorvância no ultravioleta e no visível (UV-Vis) por meio do detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, no qual utiliza o princípio da Lei de Beer-Lambert (JARDIM *et al.*, 2006). Na detecção de enantiômeros a rotação da luz é usada para identificação de compostos por meio de detectores do tipo óticoquiral. O dicroísmo circular se destaca neste tipo de análise ao utilizar a rotação da luz polarizada para a identificação de enantiômeros que são capazes de desviar a luz com a mesma intensidade, mas com direções opostas (AHUJA, 2000).

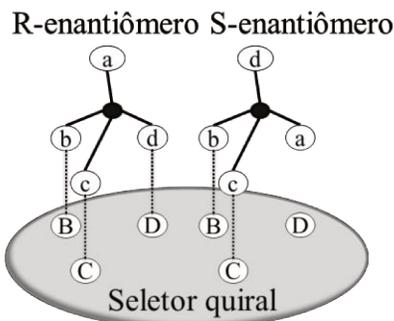
Outro aspecto importante da cromatografia líquida é a forma de eluição da fase móvel em que pode ser configurada como isocrática ou por gradiente. Na eluição por gradiente a composição da fase móvel varia durante a separação de modo a aumentar gradativamente a energia de interação entre o analito e a fase estacionária. Já na eluição

isocrática a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a separação (JARDIM *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Cromatografia líquida quiral

Os enantiômeros são moléculas não sobreponíveis sobre as suas imagens espelhadas e possuem propriedades químicas e físicas idênticas, exceto a propriedade de rotacionar o plano de luz polarizada de vibração linear e interagir enantiosseletivamente com outra molécula também quiral, normalmente uma macromolécula biológica. Dessa forma, os enantiômeros não podem ser separados por métodos convencionais como destilação ou extração, pois se comportam de forma idêntica a menos que o método de separação possua algum mecanismo de reconhecimento quiral. A cromatografia líquida pode prover este mecanismo de reconhecimento através da cromatografia líquida quiral, onde um seletor quiral é empregado no fenômeno de separação (MEYER, 2004).

O reconhecimento quiral é a capacidade do seletor quiral, presente na fase móvel ou estacionária, de distinguir cada par enantiomérico por meio de interações, onde o agente quiral do sistema e a mistura racêmica formam moléculas diastereoisoméricas espacialmente orientadas e estáveis através de forças de ligações intermoleculares. É válido ressaltar que além do reconhecimento quiral o fenômeno necessita considerar a energia livre de formação dos complexos que depende da variação de entalpia e da variação de entropia para que haja de fato a separação (JARDIM *et al.*, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2010). No modelo do reconhecimento tanto as interações atrativas como repulsivas participam da discriminação. Como ilustrado no esquema da Figura 2.2, três interações simultâneas ocorrem entre um dos enantiômeros e o seletor quiral. Estas interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor, de modo a caracterizar uma interação estereoquímica. O segundo enantiômero não interage estereoquimicamente, realizando apenas uma ou duas ligações com os sítios do seletor quiral. Por consequência, o composto com menor quantidade de ligações tende a apresentar variação de entropia mais elevada devido ao maior grau de liberdade da molécula para se movimentar no espaço (LOURENÇO *et al.*, 2010).



**Figura 2.2** – Representação esquema do reconhecimento quiral (adaptado de EASSON e STEDMAN, 1933).

Várias interações simultâneas ocorrem neste tipo de sistema, tornando complexa a predição do comportamento do complexo diastereoisomérico transitório entre o enantiômero e o seletor quiral. As interações mais fortes entre o enantiômero e o seletor quiral são interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica. As interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  e íon-dipolo são relativamente fortes. A interação do tipo dipolo-dipolo possui força intermediária, a interação dipolo-dipolo induzido é fraca e a dispersão de London é muito fraca. As interações coulômbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são atrativas (DAVANKOV, 1998; LOURENÇO *et al.*, 2010).

Outro fator relevante em cromatografia líquida quiral é a técnica empregada para a separação em que pode ser classificada como método direto ou indireto. O método direto baseia-se na diferença entre as estabilidades de ligações dos pares diastereoisoméricos e o seletor quiral presente ou na fase estacionária ou na fase móvel. O método indireto fundamenta-se na formação prévia de diastereoisômeros com reagentes quirais opticamente puros. O composto (S)-NIFE, por exemplo, pode ser empregado para realizar esta derivatização (HAGINAKA, 2002; JARDIM *et al.*, 2006; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010). O procedimento com maior destaque na separação cromatográfica de enantiômeros é o método direto que emprega fase estacionária quiral. Este modo de operar a separação cromatográfica é prático quando as condições do processo já estão estabelecidas e é relativamente econômico para aplicações analíticas e preparativas (LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Fase estacionária quiral

A fase estacionária quiral (FEQ) é o elemento da CLAE responsável pela discriminação enantiomérica. Normalmente é composta por um material de propriedade quiral que recobre, ou é quimicamente ligada a um suporte de sílica. A capacidade de separação cromatográfica de enantiômeros é afetada pelos mesmos fatores de outras cromatografias em coluna como, por exemplo, tamanho de partícula, porosidade, área superficial, vazão de eluição e dimensões da coluna. Várias FEQs foram desenvolvidas para CLAE desde meados de 1970. Após a introdução das primeiras fases disponíveis comercialmente, no início de 1980, a síntese dessas fases melhorou significativamente. (PIRKLE e POCHAPSKY, 1989; ANDERSSON e ALLENMARK, 2002; UNGER *et al.*, 2005; MAIER e LINDNER, 2006; LÄMMERHOFER, 2010).

Várias FEQs estão disponíveis comercialmente, no entanto cerca de 20 ou 30 tipos são capazes de separar a maioria dos enantiômeros. A escolha da fase estacionária e das condições cromatográficas é determinada por fatores como a seletividade, resolução e, para escalas maiores como cromatografia semipreparativa ou preparativa, também deve ser considerada a capacidade de carga da coluna, concentração desejada e velocidade de operação. As fases estacionárias são classificadas de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético (BERTHOD, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2010; LÄMMERHOFER, 2010). A Tabela (2.1) apresenta algumas fases estacionárias de acordo com o tipo de seletor quiral e as interações mais relevantes que desenvolve com os analitos dentro da coluna.

As fases quirais baseadas em polissacarídeos são as mais utilizadas para a separação de enantiômeros, visto a ampla gama de compostos que são capazes de separar, e por suportarem elevadas cargas de trabalho em escalas maiores de separação cromatográfica (UNGER *et al.*, 2005).

O emprego deste tipo fase estacionária em escala preparativa é realizado principalmente em leito móvel simulado (LMS) que consiste em uma importante técnica de separação contínua, no qual se utiliza simulações do fluxo de fase móvel através de um conjunto de colunas para promover a separação dos analitos. Nesta técnica, é possível empregar elevadas vazões do solvente acarretando no elevado consumo de solvente. Este

tipo de cromatografia é aplicado nas áreas de biotecnologia, farmacêutica e química fina (SILVA JR *et al.*, 2006; PERNA, 2013).

**Tabela 2.1** – Seletores quirais e principais interações com analitos quirais (LOURENÇO *et al.*, 2010).

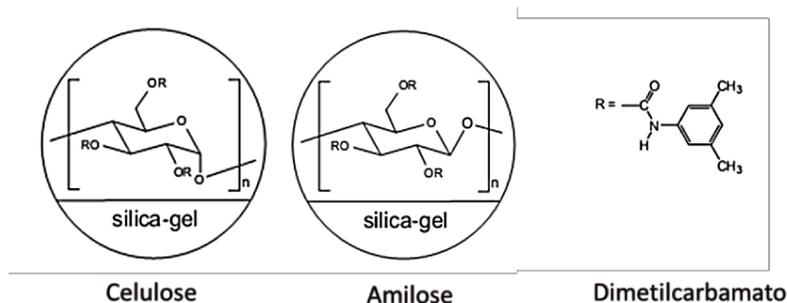
Seletor quiral	Fases estacionárias quirais	Principais interações
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interações atrativas
	Glicopeptídeos macrocíclicos	Complexo de inclusão e interações iônicas
	Cinchona	Interações eletrostáticas
Sintético	Tipo Pirkle	Interação $\pi$ - $\pi$ e ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	Polímeros impressos molecularmente	Específico para cada analito

### 2.2.2.1 Fase estacionária quiral baseada em polissacarídeo

Os seletores quirais baseados em polissacarídeos possuem tradição em separação de enantiômeros por cromatografia, visto que tais polissacarídeos apresentam considerável estabilidade mecânica e eficiência suficiente para a separação em CLAE, além disto, são abundantes biopolímeros opticamente ativos com estrutura perfeitamente definida, como no caso da celulose e amilose (YASHIMA, 2001; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

Celulose e amilose podem ser convertidas em vários derivados como acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos o que conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral melhorando, assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas (FREITAS, 2009). As fases baseadas em tris-fenilcarbamato, como a tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose ou de amilose, são as mais utilizadas devido à elevada estabilidade mecânica e grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos. Nestes derivados, os enantiômeros podem interagir com os grupos  $-NH$  e  $C=O$  da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com os grupos

C=O. A capacidade de enantiosseparação nos derivados de tris-fenilcarbamato, assim como em tris-benzoato, é fortemente influenciada pela posição e natureza dos substituintes do grupo fenila quando presente no enantiômero que se deseja separar (JARDIM *et al.*, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2010).



**Figura 2.3** – FEQ baseadas em polissacarídeos derivados de celulose e amilase (adaptado de LOURENÇO *et al.*, 2010).

Uma limitação relevante em FEQs baseadas em polissacarídeos que recobrem a sílica é que alguns solventes, como o diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, tetrahidrofurano, dioxano, tolueno e acetona podem solubilizar o seletor quiral. Para superar esta desvantagem foram desenvolvidas FEQs onde os derivados de polissacarídeos são quimicamente ligados ao suporte (LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos celulose e amilose são derivatizados em tricarbamatos ou triésteres em matriz de sílica gel pré-tratada. As FEQs baseadas em polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição: fase normal, fase reversa e polar orgânica (LOURENÇO *et al.*, 2010).. As FEQs que são recobertas por tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose são comercializadas pela Daicel Chemical Industries, Eka Chemicals, Regis, Macherey-Nagel e Phenomenex. Comercialmente a coluna tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose é nomeada por AD e a tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose por OD.

### 2.2.3 Fase móvel

Definir a fase móvel (FM) para a operação é um ponto essencial em CLAE, pois influencia diretamente na seletividade da separação, resolução, tempo de retenção e na solubilidade do racemato, que são sensíveis às variações da composição da FM (FRANCOTTE, 2001). A fase móvel exerce a função de arrastar os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participar do fenômeno de separação, onde a diferença de afinidade dos analitos com as fases contribuem para diferentes velocidades de migração dos compostos (LANÇAS, 2009).

Alguns critérios são pertinentes na escolha da fase móvel para a CLAE, como: possuir elevado grau de pureza, ter baixa viscosidade, dissolver a amostra sem decompor seus componentes, possuir baixo ponto de ebulição, em caso de misturas os componentes devem ser completamente miscíveis, ser compatível com o tipo de detector utilizado e ter polaridade adequada (JARDIM *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009). Se a amostra inclui analitos de caráter ácido, pode ser necessário utilizar aditivos como, por exemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA) ou ácido fórmico. No caso dos analitos de caráter básico pode ser empregado os aditivos trietilamina (TEA) ou dietilamina (DEA) para obter uma melhor separação. (MEYER, 2004).

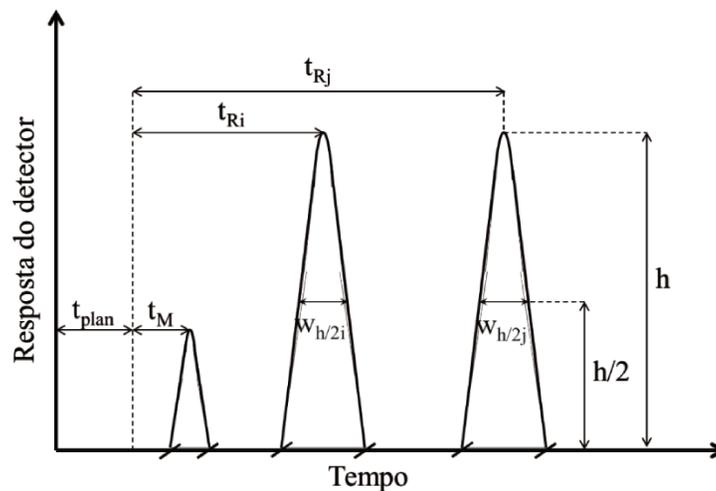
Em determinadas situações a fase móvel interfere de tal forma no sistema, que ocorre a inversão da ordem de eluição. Logo, é recomendado definir a ordem de eluição dos dois enantiômeros sob as mesmas condições em que estes foram separados. Isto pode ser realizado através da detecção polarimétrica ou realizando injeções de cada enantiômero separadamente (FRANCOTTE, 2001).

## 2.3 Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos podem ser obtidos por meio de cromatogramas, que consistem no registro de dados das substâncias que eluem da coluna ao longo do tempo. Estes dados são organizados em forma de gráfico possibilitando a identificação e quantificação dos analitos. O sinal formado pela passagem do composto pelo detector gera

um pico cromatográfico, no qual pode ser aproximado a uma curva de comportamento gaussiano (MEYER, 2004).

Um cromatograma é influenciado por vários fatores, como por exemplo, a dinâmica do fluido, os fenômenos de transferência de massa e o mais importante, pelo comportamento termodinâmico do sistema. Um cromatograma resultante de uma injeção de três componentes diferentes é ilustrado na Figura (2.4) (MEYER, 2004; SCHULTE e EPPING, 2005).



**Figura 2.4** – Cromatograma teórico para determinar os parâmetros cromatográficos (adaptado de SCHULTE e ERRPPING, 2005).

A força de interação de cada analito com a fase estacionária é proporcional ao tempo em que cada composto permanece retido na coluna cromatográfica. Diante deste contexto, é possível obter o tempo em que cada substancia interage apenas com a fase estacionária por meio do tempo de retenção corrigido ( $t'_R$ ) que pode ser obtido pela Equação (2.1) (JARDIM *et al.*, 2006).

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.1)$$

onde  $t_R$  é o tempo de retenção medido e  $t_M$  é o tempo morto do sistema. O  $t_R$  é o tempo decorrido entre a injeção da amostra na coluna e o instante em que o sinal máximo do pico

cromatográfico é atingido. O  $t_M$  é o tempo que um analito inerte leva para percorrer a coluna de modo a não interagir com a fase estacionária. Na determinação do tempo morto é necessário utilizar um composto que seja inerte no recheio da coluna e pequeno o suficiente para percolar tanto o leito como os interstícios das partículas. Os compostos tradicionalmente empregados para a cromatografia que utiliza o fenômeno de adsorção são o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB) para fase estacionária normal (recheio de caráter polar) e uracil para fase estacionária reversa (recheio de caráter apolar) (MEYER, 2004). É válido ressaltar que tanto o tempo de retenção quanto o tempo morto necessitam ser corridos pelo tempo da planta ( $t_{plan}$ ) que consiste no tempo que o analito leva para percorrer as tubulações do sistema cromatográfico até entrar na coluna. A determinação deste parâmetro pode ser obtida por injeções no cromatógrafo sem que a coluna esteja instalada.

### 2.3.1 Fator de retenção

O fator de retenção ( $k_i$ ) é a proporção quantitativa de matéria do analito entre a fase estacionária ( $n_s$ ) e a fase móvel ( $n_m$ ). A relação entre a quantidade de soluto em cada fase pode ser determinada por meio da Equação (2.2) (SNYDER *et al.*, 2010):

$$k_i = \frac{n_s}{n_m} = \frac{q_i V_s}{c_i V_m} \quad (2.2)$$

em que  $q_i$  e  $c_i$  são as respectivas concentrações do analito na fase estacionária e móvel, enquanto  $V_s$  e  $V_m$  são os volumes da fase estacionária e móvel.

Em cromatografia, se os compostos a serem separados interagem exclusivamente com o seu sítio ativo e não há outros mecanismos de adsorção para o soluto altamente diluído, o fator de retenção ( $k_i$ ) pode ser escrito em função da constante de equilíbrio de adsorção ( $K_i$ ) e a razão entre fases da coluna ( $\phi$ ). A razão entre fases da coluna

( $\phi = V_s/V_m$ ) é o quociente entre os volumes da fase estacionária ( $V_s$ ) e móvel ( $V_m$ ) e pode, razoavelmente, ser considerada constante em cromatografia líquida (RUTHVEN, 1984). Desta forma, o fator de retenção, apresentado na Equação (2.2), pode ser escrito como (LÄMMERHOFER *et al.*, 2010):

$$k_i = K_i \phi \quad (2.3)$$

Outra abordagem do fator de retenção em termos práticos de cromatografia é por meio da Equação (2.4), na qual o  $k_i$  pode ser obtido diretamente do cromatograma (MEYER, 2004; SCHULTE e EPPING, 2005):

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_M} \quad (2.4)$$

Os valores de  $k_i$  podem ainda auxiliar a interpretar e melhorar a qualidade de uma separação. O valor do fator de retenção não deve ser muito grande, por causar alargamento dos picos, e nem muito pequeno, pois significa que o composto interage pouco com a fase estacionária (MEYER, 2004; SNYDER *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Seletividade

Na abordagem cromatográfica a seletividade pode ser escrita como a razão entre os fatores de retenção do composto mais retido e do menos retido, sendo calculado pela Equação (2.5) (CASS e DEGANI, 2001).

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t_{Rj} - t_M}{t_{Ri} - t_M} \quad (2.5)$$

A seletividade ( $\alpha$ ) caracteriza a separação entre dois picos adjacentes. O valor de  $\alpha$  é dependente da fase estacionária e fase móvel, e está diretamente ligada à isoterma de adsorção. Em cromatografia linear a seletividade é constante e independe da concentração dos solutos. Este parâmetro pode ser escrito como a razão entre as constantes modificadas de Henry do composto mais retido em relação ao menos retido. Substituindo o fator de retenção (Equação 2.4) na equação da seletividade (Equação 2.5), resultando assim, na Equação (2.6). O numerador e o denominador da equação resultante devem ser multiplicados pelo termo  $\varepsilon_T/(1-\varepsilon_T)$  (SCHULTE e EPPING, 2005; FREITAS, 2009).

$$\alpha = \frac{\left( \frac{t_{Rj} - t_M}{t_M} \right) \left( \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \right)}{\left( \frac{t_{Ri} - t_M}{t_M} \right) \left( \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \right)} = \frac{K_j}{K_i} \quad (2.6)$$

sendo  $\varepsilon_T$  a porosidade total da coluna.

Para o sistema de separação cromatográfico o valor mínimo de seletividade tradicionalmente requerido para separações cromatográficas é de 1,2 (SCHULTE e EPPING, 2005).

### 2.3.3 Número de pratos teóricos

A eficiência da separação em coluna cromatográfica é determinada a partir do número de pratos teóricos ( $N_i$ ). Um prato teórico equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Desta forma, quanto maior o número de pratos maior é a eficiência da coluna e, conseqüentemente, melhor a separação (COLLINS, 2006). O valor de  $N_i$  pode ser determinado por meio da Equação (2.7) (CASS e DEGANI, 2001).

$$N_i = 5,545 \left( \frac{t'_{R_i}}{w_{h/2i}} \right)^2 \quad (2.7)$$

em que  $w_{h/2i}$  é a largura do pico à meia altura. Para avaliação da eficiência da coluna cromatográfica são aceitos valores de número de pratos acima de 2000 na separação de fármacos (DANTUS, 2004).

### 2.3.4 Resolução

A resolução ( $R_s$ ) avalia a qualidade da separação. A relação que descreve a resolução depende do número de pratos, do fator de retenção e da seletividade. Também pode ser calculada a partir da razão entre a distância que separa os pontos máximos das bandas cromatográficas e a média das larguras na meia altura dos picos ( $w_{h/2i}$  e  $w_{h/2j}$ ) dos compostos a serem separados de acordo com a Equação (2.8) (COLLINS, 2006).

$$R_s = \frac{\sqrt{N_i}}{4} \left( \frac{k_i}{k_i + 1} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) = 1,177 \frac{(t'_{R_i} - t'_{R_j})}{w_{h/2i} + w_{h/2j}} \quad (2.8)$$

Valores de resoluções iguais a 1 indicam que os picos do cromatograma estão separados com 2% de superposição das bandas. Quando  $R_s = 1,25$  há separação suficiente para fins quantitativos e  $R_s > 1,50$  indica separação completa. Para o incremento da resolução do sistema cromatográfico é possível recorrer a certas estratégias como: aumentar o valor do fator de retenção (alterando a eficiência da coluna), modificar a fluidodinâmica da coluna (diminuindo o diâmetro de partícula ou aumentando o comprimento da coluna) ou alterando a temperatura do sistema (SCHULTE e EPPING, 2005; COLLINS, 2006).

## 2.4 Termodinâmica de adsorção

A adsorção em CLAE é regida por forças de ligação entre a superfície do adsorvente e as moléculas da fase fluida. Logo se as forças de ligação dos analitos presentes na fase móvel forem distintas entre si ao interagirem com a fase estacionária ocorre a separação cromatográfica. Assim, o equilíbrio energético de ligação influencia no equilíbrio de adsorção (SCHULTE e EPPING, 2005).

Basicamente, há dois tipos diferentes de adsorção: a quimissorção e a fisiossorção. A quimissorção é causada principalmente por ligação do tipo covalente, onde as forças envolvidas são suficientes para romper as forças atômicas entre as moléculas adsorvidas e o adsorvente. No fenômeno de quimissorção em cromatografia líquida a entalpia apresenta valor modular superior a  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A fisiossorção é caracterizada por possuir ligações menos energéticas em relação à quimissorção (entalpia modular menor que  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) possibilitando o analito adsorvido manter sua identidade química e as ligações neste tipo de equilíbrio são, por exemplo, ligação de van der Waals, dipolos, forças de dispersão ou de indução (KÜMMEL e WORCH, 1990; SCHULTE e EPPING, 2005).

LÄMMERHOFER (2010) cita que a retenção enantiomérica, na maioria das vezes, é dominada por processos de adsorção que são dirigidas por interações não covalentes (geralmente tipos eletrostáticos). Em processos de separação cromatográfica é desejável que ocorra a fisiossorção para que a migração diferencial dos analitos possa promover a separação. Caso ocorra adsorção química de um ou mais compostos é necessário modificar a fase móvel de modo a regenerar a fase estacionária a fim de reutiliza-la ou obter o composto adsorvido. Também é comum ocorrer uma oposição aos efeitos entrópicos (desestabilidade), denominado de efeito de compensação. Isto pode ser prontamente explicado pelo aumento da ordem ou perda do grau de liberdade resultando na diminuição da variação de entropia do estado complexado.

### 2.4.1 Parâmetros termodinâmicos

As interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral promovem a separação por meio da formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis em CLAE

quiral, onde o fenômeno de formação pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$ ) (ROJKOVIČOVÁ *et al.*, 2004). O equilíbrio termodinâmico de adsorção é descrito por RUTHVEN (1984) como sendo equivalente a qualquer outro tipo de equilíbrio termodinâmico. É plausível admitir a análise do fenômeno de adsorção como um sistema no qual um mol do soluto ( $i$ ) é transferido da fase móvel  $i(aq)$  para a fase estacionária  $i(ad)$  em condições isotérmica e isobárica. No fenômeno de adsorção, como o ilustrado pela Equação (2.9), os potenciais químicos do soluto na fase estacionária e móvel podem ser expressos como se sugere nas Equações (2.10) e (2.11) (JIANG *et al.*, 1989):



$$\mu_{i(ad)} = \mu_{i(ad)}^0 + RT \ln a_{ad} \quad (2.10)$$

$$\mu_{i(aq)} = \mu_{i(aq)}^0 + RT \ln a_{aq} \quad (2.11)$$

onde  $\mu_{i(ad)}^0$  e  $\mu_{i(aq)}^0$  são os potenciais químicos padrões do componente  $i$  nas fases estacionária e móvel,  $a_{ad}$  é atividade da espécie  $i$  adsorvida na fase estacionária;  $a_{aq}$  é a atividade da espécie  $i$  em solução na fase móvel;  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta. Neste caso, para que o fenômeno entre em equilíbrio termodinâmico, os potenciais químicos do composto em cada fase devem ser iguais ( $\mu_{i(ad)} = \mu_{i(aq)}$ ). Deste modo, os potenciais químicos podem ser relacionados como apresentado na Equação (2.12).

$$\mu_{i(ad)}^0 - \mu_{i(aq)}^0 = -RT \ln \frac{a_{ad}}{a_{aq}} \quad (2.12)$$

A atividade ( $a = \gamma c$ ), de forma geral, está associada à concentração da espécie química ( $c$ ) no meio do qual se encontra e ao coeficiente de atividade ( $\gamma$ ). Para o sistema em condição de diluição infinita o termo correspondente à razão das atividades da Equação

(2.12) pode ser escrita de forma análoga a lei de Henry e o coeficiente de atividade considerado unitário, como mostrado na Equação (2.13) (RAWAT *et al.*, 1990; SEIDEL-MORGENSTERN e GUIOCHON, 1993).

$$\frac{a_{ad}}{a_{aq}} = \frac{\gamma_{ad} q_i}{\gamma_{aq} c_i} = K_i \quad (2.13)$$

onde  $q_i$  é a concentração do componente  $i$  na fase sólida,  $c_i$  é concentração na fase líquida e  $K_i$  é a constante de equilíbrio de adsorção do componente  $i$ . É válido ressaltar que o sistema no qual segue o modelo de solução idealmente diluída o valor de  $K_i$  também pode ser referido como constante modificada de Henry ou coeficiente de distribuição (RUTHVEN, 1984; AIROLDI e CRITTER, 1997).

A constante de equilíbrio quantifica a intensidade de interação entre o sítio de adsorção e os compostos a serem separados. A força de ligação envolvida no fenômeno está relacionada com a energia de Gibbs que por sua vez é composta pela variação de entalpia e da variação de entropia. A energia de Gibbs padrão para adsorção na fase estacionária pode ser escrita como a diferença dos potenciais químicos padrões da fase estacionária com a fase móvel ( $\Delta G_{ad,i}^0 = \mu_{i(ad)}^0 - \mu_{i(aq)}^0$ ). Desta forma, a Equação (2.12) pode ser reescrita para descrever a energia de Gibbs padrão por meio da temperatura e da constante de equilíbrio de adsorção do sistema, como apresentado na Equação (2.14) (JIANG *et al.*, 1989; AIROLDI e CRITTER, 1997; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010):

$$\Delta G_i^0 = -RT \ln K_i \quad (2.14)$$

Na Equação (2.14) a energia de Gibbs ( $\Delta G_i^0$ ) está associada com a espontaneidade da adsorção. O valor negativo deste parâmetro ( $\Delta G_i^0 < 0$ ) descreve a tendência do soluto ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. Esta equação pode ser relacionada

com a variação de entalpia e variação de entropia de sistemas líquidos por meio da clássica equação da energia de Gibbs padrão (RUTHVEN, 1984; CHESTER e COYM, 2003).

$$\Delta G_i^0 = \Delta H_i^0 - T\Delta S_i^0 \quad (2.15)$$

onde  $\Delta H_i^0$  é a variação de entalpia e  $\Delta S_i^0$  é a variação de entropia para um dado componente. Igualando e rearranjando as Equações (2.14) e (2.15), obtém-se a Equação (2.16) em que descreve a relação da constante de equilíbrio com a variação de entalpia e a variação de entropia.

$$\ln K_i = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \frac{\Delta S_i^0}{R} \quad (2.16)$$

A Equação (2.16) é uma das formas que a equação de van't Hoff pode se apresentar. Esta equação sugere a correlação linear de uma determinada faixa de temperatura, no qual os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H_i^0$  e  $\Delta S_i^0$ ) assim como a conformação estrutural da fase estacionária quiral é independente da temperatura (WENG *et al.*, 2008). Neste contexto, é possível determinar experimentalmente  $\Delta H_i^0$  e  $\Delta S_i^0$  ao se construir um gráfico de  $\ln K_i$  versus  $T^{-1}$ .

Em processos cromatográficos a constante de equilíbrio está relacionada com o fator de retenção ( $k_i$ ) e a razão entre fases ( $\phi$ ) como indicado na Equação (2.3). (RUTHVEN, 1984; TRATHNIGG e VERONIK, 2005). Logo, se o termo  $K_i$  da Equação (2.3) for isolado e substituído na Equação (2.16) é possível escrever, após certos rearranjos algébricos, a Equação (2.17) para se determinar experimentalmente  $\Delta H_i^0$  e  $\Delta S_i^0$  empregando-se parâmetros cromatográficos.

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H_i^0}{RT} + \frac{\Delta S_i^0}{R} + \ln \phi \quad (2.17)$$

A Equação (2.17) é composta por contribuições entálpicas e entrópicas. O primeiro termo da equação ( $-\Delta H^0/RT$ ) é inerente à contribuição da entalpia para  $\ln k_i$  a uma dada temperatura, enquanto que o restante da equação ( $-\Delta S^0/R + \ln \phi$ ) fornece a contribuição entrópica. A razão entre fases ( $\phi = (1 - \varepsilon_T)/\varepsilon_T$ ) é adotada como um termo entrópico, visto que representa a variação de entropia de diluição associada à transferência de soluto da fase móvel para a estacionária, onde é normalmente menor que 1 ( $\ln \phi < 0$ ) (COYM, 2010).

Esta abordagem permite descrever o fenômeno de retenção cromatográfica de acordo com a variação de entalpia e de entropia. Além disso, a análise de van't Hoff também pode ser realizada em dois sistemas cromatográficos diferentes para avaliar a diferença termodinâmica de retenção quando uma variável cromatográfica é alterada, tal como a utilização de um aditivo para a fase móvel, ou mudando a identidade ou a estrutura da fase estacionária (CHESTER e COYM, 2003).

Esta abordagem termodinâmica para enantiômeros também pode ser utilizada para outras modalidades de separações cromatográficas. MOREIRA *et al.* (2013) determinaram os valores  $\Delta H_i^0$  e  $\Delta S_i^0$  para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper hispidinervum* C. DC para a fase estacionária de fase reversa octadecilsilano utilizando a fase móvel composta de etanol (70%) e água (30%). Outro trabalho que pode ser citado é de OLIVEIRA e CREMASCO (2013) que determinaram os parâmetros termodinâmicos para a separação dos isômeros de posição timol e carvacrol utilizando a fase estacionária octadecilsilano e fase móvel composta de acetonitrila (50%) e água (50%).

Na Tabela (2.2) são apresentados alguns compostos quirais nas condições em que foram separados. Os parâmetros com o índice  $i$  representam os compostos menos retidos enquanto que  $j$  apresenta o último enantiômero eluído. Os valores de entropia obtidos da literatura, exceto FREITAS (2009), consideram a razão entre fases como um termo entrópico, sendo a relação  $\Delta S_i^* = \Delta S_i^0 + R \ln \phi$ . A variação de entropia está relacionada com o grau de liberdade das moléculas adsorvidas na fase estacionária, no qual quanto mais elevado a variação de entropia menor é o número de sítios interagindo simultaneamente entre as moléculas adsorvidas e seletor quiral (LÄMMERHOFER, 2010).

**Tabela 2.2** – Fase estacionária, fase móvel, variação de entropia e variação de entalpia da separação de enantiômeros.

Enantiômero	Informações da separação			
	Fase móvel		Fase estacionária quiral	
<b>Verapamil (PERNA, 2013)</b>	n-hexano(90%) etanol (5%) isopropanol (5%) DEA(0,1%)		tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
	-16,36	-17,48	-45,39	-46,64
<b>Secnidazol (NASCIMENTO, 2012)</b>	isopropanol(60%) acetonitrila(40%)		tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
	-6,19	-10,87	-10,78	-48,50
<b>Omeprazol (FREITAS, 2009)</b>	Fase móvel metanol (100%)		Fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
	-17,80	-16,00	-40,00	-36,00
<b>fmoc-poac (VIEIRA, 2011)</b>	Fase móvel n-hexano (90%) isopropanol (10%)		Fase estacionária quiral tris (3-cloro-4- dimetilfenilcarbamato) de celulose	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
	-11,01	-11,52	-37,68	-29,32
<b>Omeprazol (ROSA, 2005)</b>	Fase móvel n-hexano (92%) isopropanol (8%) TEA(0,15%) ácido acético glacial (0,5%)		Fase estacionária quiral O,O'-bis[4-terc-butylbenzoi]-N,N'- dialil-L-tartardiamida	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^*$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
	-13,38	-15,42	-15,42	-37,24
<b>Cetamina (SILVA, 2003)</b>	Fase móvel etanol (100%)		Fase estacionária quiral triacetado de celulose microcristalina	
	$\Delta H_i^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_j^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_i^*$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_j^*$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
	-19,91	-26,02	-	-

Normalmente a adsorção de enantiômeros em colunas quirais é um fenômeno exotérmico ( $\Delta H < 0$ ), em que a separação pode ser caracterizada pela diminuição da seletividade com o incremento da temperatura. Fenômenos endotérmicos de adsorção também são encontrados, no entanto são menos observados na literatura (LÄMMERHOFER, 2010).

Em termos termodinâmicos de separação cromatográfica é possível correlacionar a variação de energia de Gibbs de adsorção de um componente  $j$  ( $\Delta G_j^o$ ) mais retido com a energia Gibbs de um componente  $i$  ( $\Delta G_i^o$ ) menos retido. Esta relação pode ser realizada por meio da diferença da energia de Gibbs de adsorção de cada um dos enantiômeros ( $\Delta\Delta G_{j,i}^0 = \Delta G_j^0 - \Delta G_i^0$ ) de acordo com a Equação (2.18) (BERTHOD *et al.*, 2004; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

$$\Delta\Delta G_{j,i}^0 = -RT \ln \frac{K_j}{K_i} \quad (2.18)$$

A diferença da energia de Gibbs de adsorção dos componentes  $i$  e  $j$  ( $\Delta\Delta G_{j,i}^0 = \Delta G_j^0 - \Delta G_i^0$ ) também pode ser aplicada na equação clássica da energia padrão de Gibbs (Equação 2.15), onde o termo  $\Delta\Delta G_{j,i}^0$  pode ser expresso utilizando-se a variação da variação de entalpia ( $\Delta\Delta H_{j,i}^0 = \Delta H_j^0 - \Delta H_i^0$ ) e variação da variação de entropias ( $\Delta\Delta S_{j,i}^0 = \Delta S_j^0 - \Delta S_i^0$ ) dos componentes como ilustrado pela Equação (2.19) (PÉTER *e. al.*, 1998).

$$\Delta\Delta G_{j,i}^0 = \Delta\Delta H_{j,i}^0 - T\Delta\Delta S_{j,i}^0 \quad (2.19)$$

A Equação (2.18) pode ser reescrita em termos das variações das variações de entalpia e de entropia com o auxílio da Equação (2.19). Em termos cromatográficos, a seletividade também pode ser inserida na Equação (2.18), visto que segundo a

Equação (2.5) o termo  $K_j/K_i$  é igual a  $\alpha$  (BERTHOD *et al.*, 2004; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

$$\Delta\Delta H_{j,i}^0 - T\Delta\Delta S_{j,i}^0 = -RT \ln \alpha \quad (2.20)$$

A Equação (2.20) pode ser linearizada de forma análoga à Equação (2.17), como apresentado na Equação (2.21) (BERTHOD *et al.*, 2004; LÄMMERHOFER *et al.*, 2010).

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta G_{j,i}^0}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H_{j,i}^0}{RT} + \frac{\Delta\Delta S_{j,i}^0}{R} \quad (2.21)$$

Outro parâmetro relevante é a temperatura isoenantiosseletiva ( $T_{iso}$ ). A temperatura isoenantiosseletiva é a temperatura na qual a separação cromatográfica não ocorre, pois as interações de ambos enantiômeros com a fase estacionária possuem energias de ligações equivalentes ( $K_i = K_j$ ). Neste caso a seletividade, definida como a razão entre as constantes de equilíbrio (Equação (2.6)), é igual a 1 não havendo separação ( $\Delta\Delta G_{j,i}^0 = 0$ ). Aplicando esta condição na Equação (2.21) pode-se escrever a Equação (2.22) (CIRILLI *et al.*, 2004; FREITAS, 2009; MOREIRA, 2013). Quando a separação ocorre acima da  $T_{iso}$  a ordem de eluição é invertida e  $\Delta\Delta S_{j,i}^0$  passa a controlar o fenômeno (FREITAS, 2009).

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H_{j,i}^0}{\Delta\Delta S_{j,i}^0} \quad (2.22)$$

O reconhecimento quiral, na maioria dos casos, é controlado entalpicamente ( $|\Delta\Delta H_{j,i}^0| > |T\Delta\Delta S_{j,i}^0|$  ou  $|\Delta H^0| > |T\Delta S^0|$ ). Ou seja, no fenômeno de adsorção a variação de entalpia contribui de forma mais acentuada para a energia de Gibbs em relação a contribuição entrópica. É válido ressaltar que o fenômeno de adsorção cromatográfico deve ser espontâneo ( $\Delta G^0 < 0$ ). Na minoria dos casos o reconhecimento é controlado de forma

entrópica ( $|T\Delta\Delta S_{j,i}^0| > |\Delta\Delta H_{j,i}^0|$  ou  $|T\Delta S^0| > |\Delta H^0|$ ) (LÄMMERHOFER, 2010).

A Tabela (2.3) apresenta alguns valores de  $\Delta\Delta H_{j,i}^0$ ,  $\Delta\Delta S_{j,i}^0$  e  $T_{iso}$  da literatura.

**Tabela 2.3** – Enantiômeros e parâmetros termodinâmicos.

Enantiômero	Informações da separação		
	Fase móvel		Fase estacionária quiral
<b>Verapamil</b> (PERNA, 20013)	n-hexano(90%) etanol (5%) isopropanol (5%) DEA (0.1%)		tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
	$\Delta\Delta H_{j,i}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S_{j,i}^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)
	-1,10	-0,95	1063,16
<b>Secnidazol</b> (NASCIMENTO , 2012)	isopropanol(60%) acetonitrila(40%)		tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
	$\Delta\Delta H_{j,i}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S_{j,i}^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)
	4,67	32,06	152
<b>fmoc-poac</b> (VIEIRA, 2011)	n-hexano (90%) isopropanol (10%)		tris (3-cloro-4- dimetilfenilcarbamato) de celulose
	$\Delta\Delta H_{j,i}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S_{j,i}^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)
	-0,46	8,65	-
<b>Omeprazol</b> (FREITAS, 2009)	metanol (100%)		tris (3,5- dimetilfenilcarbamato) de amilose
	$\Delta\Delta H_{j,i}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S_{j,i}^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)
	-19,00	-4,00	475,00
<b>Omeprazol</b> (ROSA, 2005)	n-hexano (92%) isopropanol (8%) TEA(0.15%) ácido acético glacial (0.5%)		O,O'-bis[4-terc-butilbenzoi]- N,N'-dialil-L-tartardiamida
	$\Delta\Delta H_{j,i}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S_{j,i}^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)
	-2,05	-4,75	431,58

Outro fato interessante é a possibilidade de utilizar a  $T_{iso}$ , como referência no controle entálpico e entrópico. Os estudos de separação quiral encontrados na literatura tendem a ser realizados próximos da temperatura ambiente, por motivos óbvios como facilidade no controle térmico, limitações do equipamento e menor custo operacional. Tendo isto em vista, a temperatura isoenantiosseletiva, na maioria dos casos, está acima das temperaturas empregadas no estudo, de modo que o controle do reconhecimento quiral é entálpico (LÄMMERHOFER, 2010).

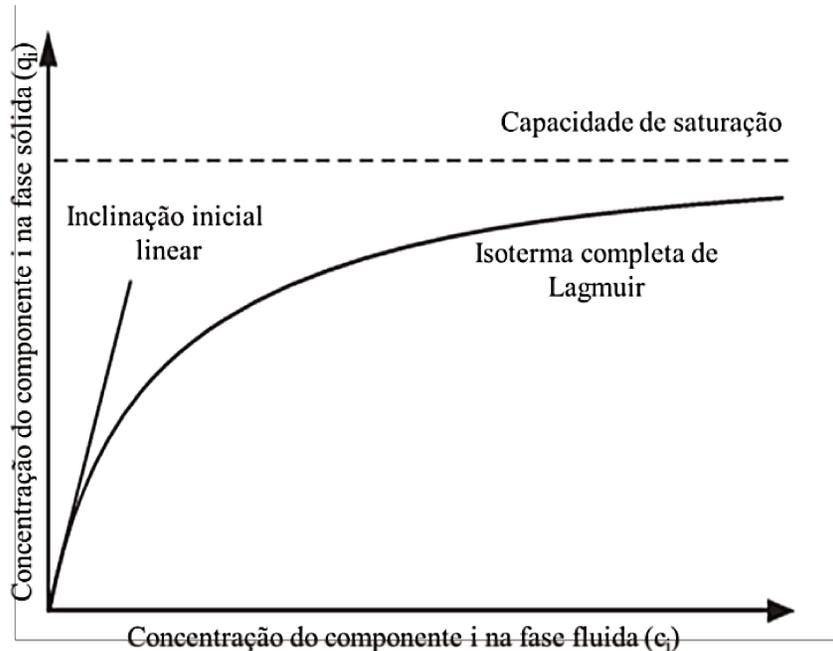
#### 2.4.2 Modelos de isoterma de adsorção

A isoterma de adsorção descreve quantitativamente a distribuição do soluto entre as fases estacionária e móvel tendo como um dos principais parâmetros a constante de equilíbrio. Os parâmetros da isoterma e os termodinâmicos (variação de entalpia ( $\Delta H^0$ ), variação de entropia ( $\Delta S^0$ ) e energia de Gibbs ( $\Delta G^0$ )) são capazes de fornecer informações relevantes acerca do fenômeno envolvido na separação cromatográfica, além de auxiliar a propor novas rotas de separação para otimizar o processo, predizer taxas de produção e extensões da purificação (JACOBSON *et al.*, 1984; MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

A Figura (2.5) apresenta a clássica isoterma de adsorção de Langmuir para um componente. A região inicial deste gráfico pode ser interpretada matematicamente por uma relação linear que descreve a condição de diluição, no qual não ocorre disputa entre as moléculas de soluto por sítios ativos (GILES *et al.*, 1960). Em âmbito cromatográfico, colunas bem empacotadas geram picos simétricos nesta região da isoterma. Deste modo, a região linear é largamente empregada para análises cromatográficas quantitativas em escala analítica. Além disso, também é empregada para a obtenção de parâmetros de equilíbrio de adsorção em sistemas cromatográficos que possui por finalidade trabalhar em condição não linear em que utilizam elevadas cargas de soluto (SCHULTE e EPPING, 2005). A relação que descreve a isoterma linear é apresentada pela Equação (2.23).

$$q_i = K_i c_i \tag{2.23}$$

onde  $q_i$  é a quantidade adsorvida de componente  $i$  na fase sólida,  $c_i$  é a concentração do componente  $i$  na fase líquida, e  $K_i$  é a constante de equilíbrio de adsorção.



**Figura 2.5** – Perfil da isoterma de adsorção linear e de Langmuir para um composto (adaptado de SCHULTE e EPPING, 2005).

Esta relação linear também é chamada de lei de Henry, por analogia com o comportamento limite de soluções de gases em líquidos sendo a constante de proporcionalidade, que é simplesmente a constante do equilíbrio de adsorção, referida como constante modificada de Henry, para sistema diluído (RUTHVEN, 1984). Em sistemas cromatográficos, quanto maior for o coeficiente de equilíbrio de adsorção maior é a força envolvida no fenômeno aumentando o tempo de retenção do composto (RUTHVEN, 1984; SCHULTE e EPPING, 2005).

Em adsorção são vários os modelos que descrevem matematicamente as diversas isotermas não lineares, no entanto, em cromatografia líquida, o modelo mais comum é o de Langmuir. O pico cromatográfico deste modelo é caracterizado por um pico assimétrico com efeito da cauda do lado direito do cromatograma. Este modelo considera que o fenômeno ocorre em uma superfície do tipo monocamada, composta por um número fixo de sítios homogêneos disponíveis para a adsorção, onde cada molécula é adsorvida por um

sítio ativo até que a superfície seja saturada. A isoterma de Langmuir é representada pela Equação (2.24) e seu perfil está ilustrado na Figura (2.5) (LANGMUIR, 1916; JAMES *et al.*, 1999; SCHULTE e EPPING, 2005).

$$q_i = q_{sat} \frac{b_i c_i}{1 + b_i c_i} = \frac{K_i c_i}{1 + b_i c_i} \quad (2.24)$$

em que  $q_{sat}$  é a capacidade de saturação do adsorvente, e  $b_i = K_i/q_{sat}$  é um parâmetro relacionado com a afinidade do adsorvente pelo adsorbato.

Em determinadas situações quando se trabalha com CLAE de fase reversa ou quiral é possível haver um segundo tipo de sítio disponível para o analito interagir. Neste caso outro termo é adicionado a Equação (2.24) de acordo com a Equação (2.25) também conhecida pelo modelo bi-Lagmuir (GRAHAM, 1953; GUIOCHON, 1994; SCHULTE e EPPING, 2005):

$$q_i = q_{1,sat} \frac{b_{1,i} c_i}{1 + b_{1,i} c_j} + q_{2,sat} \frac{b_{2,i} c_i}{1 + b_{2,i} c_j} \quad (2.25)$$

Outro modelo a ser citado para separações cromatográficas de enantiômeros é o modelo de Langmuir competitivo modificado. Na Equação (2.26) o termo  $h_i$  refere-se à o parâmetro linear (RODRIGUES *et al.*, 1995; PERNA 2013)

$$q_i = h_i c_i + q_{sat} \frac{b_i c_i}{1 + b_{1,i} c_i + b_{2,j} c_j} \quad (2.26)$$

As isotermas tradicionalmente utilizadas em cromatografia são Langmuir e Langmuir competitivo modificado. Há outros modelos que descrevem a distribuição do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, como por exemplo, o modelo de Tóth ((TÓTH, 1971; KACZMARSKI *et al.*, 2002; SCHULTE e EPPING, 2005) e Freundlich (FREUNDLICH, 1916; LEVAN *et al.*, 1997).

### 2.4.3 Constante de equilíbrio de adsorção linear pela análise do primeiro momento do pulso cromatográfico

Em cromatografia, os modelos que melhor descrevem as isotermas de adsorção entre o analito e a fase estacionária possuem em comum a constante de equilíbrio de adsorção (SCHULTE e EPPING, 2005). A isoterma linear, por exemplo, depende apenas deste parâmetro. A constante de modificada de Henry é importante para o dimensionamento de métodos e modelagem de sistemas cromatográficos que trabalham em altas concentrações de soluto.

A constante de equilíbrio pode ser determinada por meio do método do primeiro momento cromatográfico. O método dos momentos fundamenta-se no estudo da concentração do soluto na saída de um leito fixo em resposta ao pulso de concentração na entrada do leito de uma coluna. ARNOLD *et al.* (1985) citam que a forma mais geral da análise do pulso foi realizada por SCHNEIDER e SMITH (1968) com base na teoria de momentos estatísticos de KUBIN (1960) e KUČERA (1965). Esta análise tem sido estudada para uma ampla variedade de sistemas cromatográficos, no qual em condições adequadas pode fornecer parâmetros inerentes ao equilíbrio termodinâmico ou de transferência de massa (RUTHVEN, 1984; ARNOLD *et al.*, 1985; GUIOCHON *et al.*, 1994; CREMASCO *et al.*, 2001; GUIOCHON, *et al.*, 2007).

O sistema de equações envolvido no método dos momentos foi resolvido no domínio de Laplace, onde a solução da transformada foi utilizada para derivar expressões dos momentos inerentes ao pico cromatográfico. Por definição dos momentos de uma distribuição, o  $n$ -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento ( $L$ ) é dado pela Equação (2.27). Esse  $n$ -ésimo momento na forma absoluta e central é dado pelas Equações (2.28) e (2.29), respectivamente (GUIOCHON *et al.*, 1994).

$$M_n = \int c(t, L)t^n dt \quad (2.27)$$

$$\mu_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L)t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L)dt} \quad (2.28)$$

$$\frac{-}{\mu_n} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L)(t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L)dt} \quad (2.29)$$

As informações sobre o equilíbrio de retenção são dadas a partir do primeiro momento absoluto ( $\mu_1$ ). Nesta abordagem, o estudo do perfil de eluição cromatográfico está relacionado com a condição de linearidade da isoterma de adsorção, no qual é caracterizada por um pulso simétrico e gaussiano (MIYABE *et al.*, 2003). Caso a condição de diluição for contemplada o primeiro momento refere-se ao tempo de retenção do composto injetado na coluna. O teorema de Van der Laan é empregado no domínio de Laplace para obter uma descrição analítica do primeiro momento como apresentado na Equação (2.30) (RUTHVEN, 1984; ARNOLD *et al.*, 1985; GUIOCHON *et al.*, 1994; CREMASCO *et al.*, 2001; GUIOCHON *et al.*, 2007).

$$t_R - \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) (\varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) K_i) \right] \quad (2.30)$$

em que  $t_{inj}$  é o tempo de injeção,  $L$  é a comprimento efetiva da coluna,  $\varepsilon$  é a fração de vazios do leito,  $u$  é a velocidade intersticial da fase móvel,  $t_R$  é o tempo de retenção do composto corrigido pelo tempo da planta ( $t_{plan}$ ),  $\varepsilon_p$  é a porosidade da partícula e  $K_i$  é a constante de equilíbrio de adsorção linear.

Com o intuito de simplificar a determinação da constante de equilíbrio de adsorção certas modificações podem ser aplicadas na Equação (2.30). A primeira refere-se em reescrever a velocidade intersticial ( $u = v/\varepsilon$ ) em função da velocidade superficial ( $v$ ) e porosidade do leito ( $\varepsilon$ ), enquanto que a segunda é adequar a equação da porosidade total

isolando a porosidade da partícula ( $\varepsilon_p = (\varepsilon_T - \varepsilon)/(1 - \varepsilon)$ ) para substituir na Equação (2.30) (SCHULTE e EPPING, 2005). Desse modo a Equação (2.31) é apresentada como:

$$t_R - \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{v} [\varepsilon_T + (1 - \varepsilon_T)K_i] \quad (2.31)$$

A constante de equilíbrio do analito com a fase estacionária pode ser obtida por meio da inclinação da relação linear de  $v^{-1}$  versus  $\mu_1$ , em que o primeiro momento pode ser aproximando ao tempo de retenção ( $t_R$ ) devido ao tempo de injeção,  $t_{inj}$ , ser desprezível. É interessante notar que a Equação (2.31) possibilita determinar  $K_i$ , em condição de diluição infinita, utilizando apenas a porosidade total e a altura efetiva do leito da coluna que pode ser facilmente obtida.

## 2.5 Obtenção das porosidades por meio da análise do primeiro momento

As porosidades do leito ( $\varepsilon$ ), total ( $\varepsilon_T$ ) e da partícula ( $\varepsilon_p$ ) são importantes parâmetros do segundo momento, no qual auxilia o estudo da cinética de transferência de massa (RUTHVEN, 1984; GUIOCHON *et al.*, 1994; CREMASCO *et al.*, 2001). Além disso, a obtenção da razão entre fases ( $\phi = (1 - \varepsilon_T)/\varepsilon_T$ ) e a constante de equilíbrio de adsorção linear determinada pela Equação (2.31) dependem da porosidade total da coluna para serem calculadas.

Com a abordagem do primeiro momento do pulso cromatográfico ainda é possível determinar tanto a porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) quanto também a porosidade total ( $\varepsilon_T$ ). A  $\varepsilon_T$ , definida na Equação (2.33), pode ser obtida por meio de um o analito que percole o leito e se difunda para dentro das partículas empacotadas e que não interaja com o recheio da coluna ( $K_i = 0$ ). Em sistemas cromatográficos de fase estacionária normal os compostos inertes empregados são, por exemplo, o tolueno ou o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB), enquanto que na cromatografia em fase reversa é utilizado o uracil (SCHULTE e EPPING,

2005). Desta forma, a Equação (2.31) pode ser simplificada como mostrada na Equação (2.32):

$$t_R - \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{v} \varepsilon_T \quad (2.32)$$

$$\varepsilon_T = \frac{V_{int} + V_p}{V_c} = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (2.33)$$

onde  $V_{int}$ ,  $V_p$  e  $V_c$  são os volumes intersticial, do poro e da coluna.

É interessante notar que o tempo de retenção do composto inerte, na Equação (2.32), nada mais é que tempo morto da coluna ( $t_M$ ). Para sua determinação é necessário descontar o tempo da planta ( $t_{plan}$ ).

A porosidade do leito é definida como apresentado na Equação (2.35). Na sua determinação pelo primeiro momento é necessário empregar um composto similar ao inerte ( $K_i = 0$ ) empregado na obtenção da porosidade total, no entanto este analito deve ser grande o suficiente para não penetrar no poro das partículas do leito. Em sistemas que utilizam fase estacionária reversa o poliestireno pode ser utilizado. Já em cromatografia normal o azul de dextrana deve ser empregado (SILVA JR, 2003; SCHULTE e EPPING, 2005). A Equação (2.34) ilustra a relação linear do primeiro momento para a determinação de  $\varepsilon$ .

$$t_R - \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{v} \varepsilon \quad (2.34)$$

$$\varepsilon = \frac{V_{int}}{V_c} \quad (2.35)$$

A porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ), definida como mostrada na Equação (2.36), pode ser determinada pelo lado direito da Equação (2.33). Esta porosidade, diferentemente das

porosidades do leito e total, não depende do empacotamento da coluna, sendo um parâmetro característico do material que constitui o recheio.

$$\varepsilon_p = \frac{V_p}{V_c} \tag{2.36}$$



## 3. Materiais e métodos

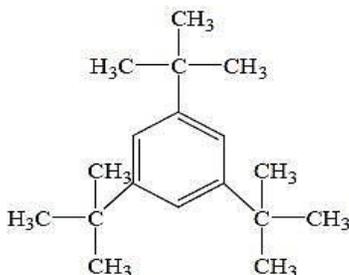
---

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Ibuprofeno padrão e composto inerte

No trabalho realizado utilizou-se a mistura racêmica do ibuprofeno de pureza de 98% adquirido na empresa Sigma-Aldrich (EUA).

O composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB), massa molar  $246,44 \text{ g mol}^{-1}$  e pureza 97% foi utilizado para se determinar o tempo morto e a porosidade total das colunas cromatográficas. O TTBB por ser uma molécula relativamente pequena é capaz de penetrar tanto nos poros das partículas que compõe o leito quanto no volume vazio entre as partículas, sem que seja adsorvida pela superfície da fase estacionária (NASCIMENTO *et al.*, 2012). O TTBB foi adquirido na Sigma-Aldrich (EUA) e sua estrutura é mostrada na Figura (3.1).



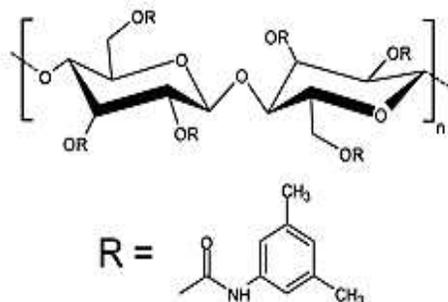
**Figura 3.1** – Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB).

### 3.1.2 Solventes orgânicos

Os solventes utilizados nos experimentos foram n-hexano, isopropanol, etanol, n-butanol e acetonitrila, todos grau HPLC e adquiridos junto à TEDIA<sup>®</sup> (EUA). Eles compõem a fase móvel do sistema cromatográfico e também são empregados no preparo das amostras. O aditivo usado foi o ácido trifluoracético 99% adquirido da Sigma-Aldrich (EUA).

### 3.1.3 Fase estacionária

No desenvolvimento do trabalho utilizaram-se duas colunas cromatográficas, ambas polissacarídicas recheadas com a fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. A primeira coluna utilizada foi a coluna de aço inox com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, no qual possui um leito fixo constituído por partículas de sílica com 20 µm de diâmetro recoberta com a fase estacionária quiral. A segunda coluna foi a Lux 5u Cellulose-1 adquirida na empresa Phenomenex<sup>®</sup> que possui estrutura de aço inox e diâmetro de partícula de 5µm e dimensões de 250 mm por 4,6 mm.

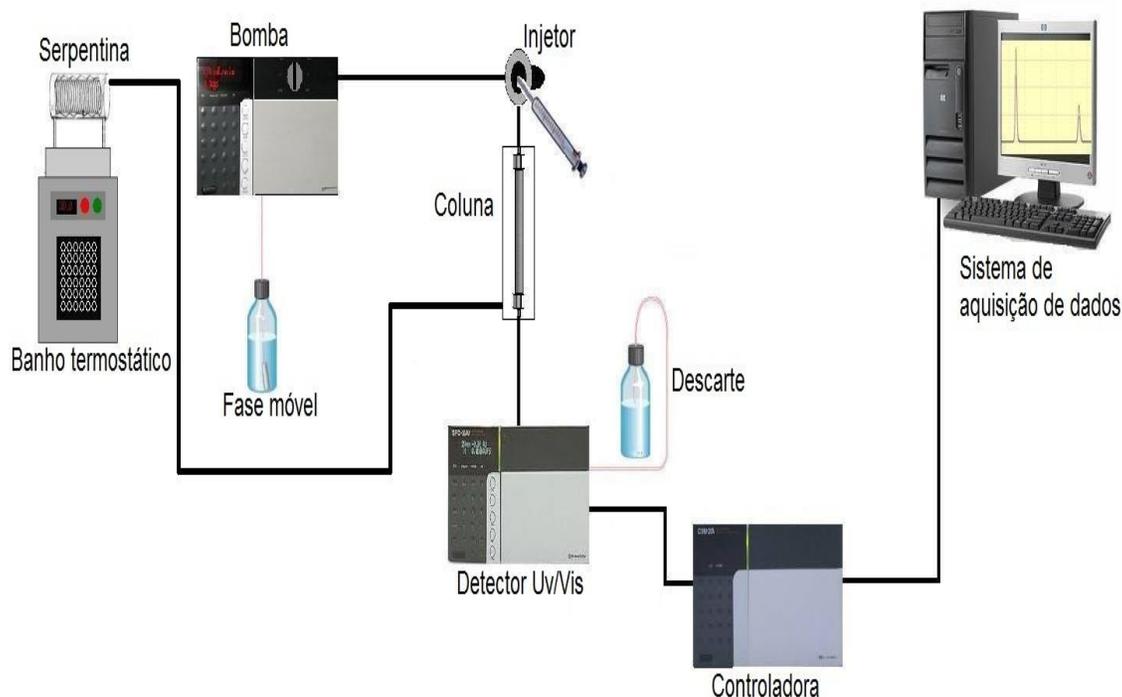


**Figura 3.2** – Estrutura química da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (adaptado de da SILVA JR *et al.*, 2006).

### 3.1.4 Equipamentos

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3.3), constituído por:

- uma bomba da marca Shimadzu Corporation®/ Modelo LC-20 AT (Japão);
- uma placa controladora da marca Shimadzu Corporation®/ Modelo CBM-20A/UFLC (Japão);
- um detector Shimadzu Corporation®/ Modelo SPD- 20A (Japão) com detecção UV-Vis;
- software para integração dos equipamentos cromatográficos LCsolution® versão 1.23 da Shimadzu Corporation® (Japão).



**Figura 3.3-** Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (adaptado de MOREIRA, 2013).

Na verificação da ordem de eluição foi utilizado o dicróismo circular Jasco modelo CD2095plus (Japão) acoplado no CLAE e polarímetro Jasco P1010 (Japão) com cubeta de 10 mL. As soluções utilizadas na análise foram concentradas utilizando um banho refrigerado Edacol modelo RTE-110 (EUA), um rotaevaporador modelo 803 e um banho aquecido modelo 558, ambos da marca Fisatom (Brasil)

A varredura espectrofotométrica foi efetuada no espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo Electron Corporation®/ Modelo Genesys 6 (EUA). No controle da temperatura foi utilizado o banho termostaticado da marca Quimis/Moledo Q-214m2 (Brasil), com precisão de 0,5 °C. As amostras foram injetadas no sistema manualmente com o auxílio de uma seringa de vidro de 250 µL Modelo Microliter™ 725 (Hamilton Co., EUA). No preparo das amostras usou-se a balança analítica da marca Mettler®/ Modelo AJ150 (Suíça).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Definição da fase móvel**

A escolha da fase móvel foi realizada inicialmente por uma pesquisa na literatura (DUCRET *et al.*, 1995 e BONATO *et al.*, 2003) e catálogos técnicos de separação quiral (Phenomenex® e Chiral Technologies Europe®) para obter uma noção preliminar da fase móvel a ser utilizada.

Os experimentos foram conduzidos por meio de injeções de 20 µL à concentração 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno racêmico diluído nas fases móveis testadas à vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 25 °C. Os critérios de escolha da fase móvel foram os parâmetros cromatográficos: seletividade (Equação (2.5)), resolução (Equação (2.8)) e número de pratos teóricos (Equação (2.7)).

### **3.2.2 Ordem de eluição dos componentes da mistura racêmica**

A ordem de eluição foi verificada por meio de um polarímetro e um detector baseado em dicroísmo circular e UV-Vis acoplado ao CLAE. O cromatógrafo foi operado na temperatura de 25 °C, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de 254 nm, polaridade negativa e a fase móvel empregada foi n-hexano e isopropanol (99/1) com 0,1% em volume de TFA. Foram injetadas amostras na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno racêmico diluído em fase móvel com um *looping* de 20 µL. O detector gerou os cromatogramas UV-Vis e o de dicroísmo.

Para a utilização do polarímetro foram realizadas separações prévias em CLAE para obter uma alíquota suficiente dos enantiômeros separados. As condições de separação foram as mesmas que as empregadas com o dicróismo circular/UV-Vis acoplados no CLAE, no entanto, utilizou-se a concentração de  $40 \text{ g L}^{-1}$  e os picos foram coletados ao fim da separação. Os volumes dos enantiômeros coletados foram concentrados em um rotaevaporador e suas respectivas concentrações foram determinadas com por meio de uma curva de calibração apresentada no Apêndice A. Ambas as amostras foram analisadas no polarímetro com o comprimento de onda de  $589 \text{ nm}$  para confirmar a ordem de eluição dos enantiômeros através do desvio do ângulo da luz polarizada. A cubeta utilizada foi de  $10 \text{ mL}$  e  $10 \text{ cm}$  de comprimento.

### 3.2.3 Determinação da porosidade total

A porosidade total ( $\varepsilon_T$ ) foi determinada com base no método do primeiro momento de um pulso cromatográfico. Esta abordagem para obter  $\varepsilon_T$  requer pulsos cromatográficos com um composto inerte que não interaja com a fase estacionária e seja pequeno o suficiente para se difundir no interior dos poros das partículas e também no leito da coluna. Para tal, foi utilizado o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB) que é inerte em fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e que possui tradição na determinação de porosidade total em colunas de fase reversa.

O método do primeiro momento foi realizado com pulsos cromatográficos de  $20 \mu\text{L}$  em diversas vazões à temperatura constante de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e em duplicata. Utilizou-se vazões de  $0,2$  até  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  com o passo de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ . As soluções injetadas eram de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de TTBB diluído em fase móvel (n-hexano e isopropanol (99/1) com  $0,1\%$  de TFA). O detector foi ajustado para  $254 \text{ nm}$ .

Ao se empregar o método, obteve-se o tempo da planta ( $t_{plan}$ ) que consiste no tempo em que o composto percorre apenas a tubulação do equipamento. Para tal, foram injetadas amostras no CLAE sem a coluna em cada uma das vazões. Em seguida, com a

coluna já instalada no equipamento, foram determinados os tempos de retenção do TTBB corrigido pelo  $t_{plan}$ .

Os dados provenientes destes ensaios foram linearizados de acordo com o método do primeiro momento segundo a Equação (2.32) para a determinação da porosidade total. Na determinação das velocidades superficiais utilizou-se a razão entre a vazão, no qual o pulso foi realizado e a área transversal da coluna calculada pelo diâmetro interno da coluna.

### 3.2.4 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos estudados foram: seletividade ( $\alpha$ ) (Equação 2.5), resolução ( $R_s$ ) (Equação 2.8) e número de pratos teóricos ( $N_i$ ) (Equação 2.7). As respostas das injeções foram determinadas em duplicata através do cromatograma gerado pelo detector UV-Vis nos comprimentos de 220 nm e 254 nm. A vazão empregada foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Para a determinação do tempo morto ( $t_M$ ) foi utilizado o composto inerte TTBB nas mesmas condições da separação.

### 3.2.5 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os cálculos dos parâmetros termodinâmicos foram fundamentados na abordagem de van't Hoff. Neste estudo, foram injetados volumes de 20 µL de uma solução de 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno diluídos em fase móvel (n-hexano e isopropanol (99/1) com 0,1% de TFA) nas temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. O tempo morto foi determinado com injeções do composto inerte TTBB na mesma vazão empregada no experimento, 1 mL min<sup>-1</sup>.

Na determinação da variação de entalpia ( $\Delta H^0$ ) e da variação de entropia ( $\Delta S^0$ ) foi empregada a linearização proposta pela Equação (2.17),  $\ln k$  versus  $T^{-1}$ . O coeficiente angular forneceu informações para a obtenção da variação de entalpia, enquanto que o coeficiente linear juntamente com a relação da razão de fases ( $\phi = (1 - \varepsilon_T) / \varepsilon_T$ ) proporcionou a obtenção da variação de entropia.

O cálculo da variação da variação de entalpia ( $\Delta\Delta H_i^0$ ) e variação da variação de entropia ( $\Delta\Delta S_i^0$ ) foi obtido pela relação linear descrita pela Equação (2.21) de  $\ln \alpha$  versus  $T^{-1}$ . A temperatura isoenantiosseletiva foi calculada com a Equação (2.22)

### 3.2.6 Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção linear

As constantes de equilíbrio ( $K_i$  e  $K_j$ ) foram determinadas com o método do primeiro momento para as temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. As vazões empregadas no estudo variaram entre 0,6 até 1,6 mL min<sup>-1</sup> com o passo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Em cada vazão foram injetadas 20 µL de soluções à 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno diluído em FM. A fase móvel empregada foi n-hexano e isopropanol (99/1) com 0,1% de TFA.

O procedimento experimental para a obtenção de dados dos tempos de retenção e velocidade da fase móvel foi análogo ao empregado na determinação da porosidade total, onde foi utilizado o TTBB para a determinação do tempo da planta ( $t_{plan}$ ), a fim de obter o tempo de retenção do composto apenas na coluna ( $t_R$ ).

Para o cálculo das constantes foi utilizado a relação linear proposta pela Equação (2.31), em que relaciona o tempo de retenção com o inverso da velocidade superficial. Nesta determinação, o coeficiente angular, o comprimento do leito da coluna ( $L = 25$  cm) e a porosidade total são necessários para a determinação das constantes.



## 4. Resultados e discussão

---

### 4.1 Testes preliminares

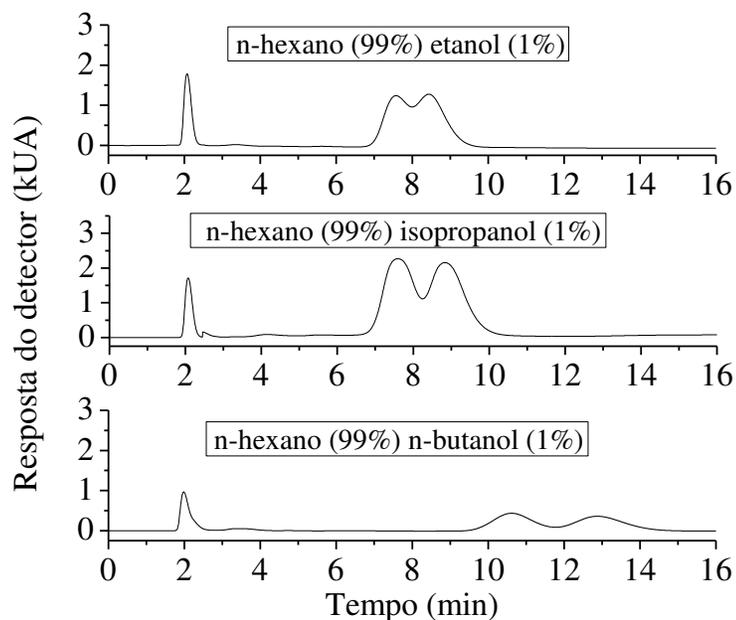
Nesta primeira etapa da presente Dissertação de Mestrado foram analisadas duas colunas de fase normal para a separação do ibuprofeno racêmico, ambas com o mesmo tipo de recheio. A Tabela (4.1) apresenta o resumo das características de ambas as colunas.

**Tabela 4.1** – Colunas com partículas recobertas com tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose utilizadas na separação do ibuprofeno.

Nome	Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
Coluna OD 20 $\mu\text{m}$	20	150	4,6
Coluna OD 5 $\mu\text{m}$	5	250	4,6

#### 4.1.1 Coluna OD 20 $\mu\text{m}$

A primeira fase móvel testada na coluna OD 20  $\mu\text{m}$  empregou-se o n-hexano por ser um composto extremamente apolar a fim de favorecer a interação do ibuprofeno com a fase estacionária. Entretanto o racemato permaneceu retido por um período demasiadamente longo na fase estacionária. Optou-se por uma mistura binária constituída por n-hexano e um álcool. Um aditivo, o ácido trifluoroacético, foi empregado a 0,1% do volume. Os álcoois empregados foram etanol, isopropanol e n-butanol. A Figura (4.1) apresenta três cromatogramas obtidos na temperatura de 25 °C.



**Figura 4.1** – Separação de ibuprofeno racêmico na coluna OD 20  $\mu\text{m}$ . Injeções de 20  $\mu\text{L}$  da solução de 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de ibuprofeno para três fases móveis distintas na temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Na Figura (4.1) o primeiro pico é o TTBB, enquanto que os dois outros são os enantiômeros. O emprego dos álcoois na fase móvel colaborou para obter um tempo de retenção menor em relação a primeira fase móvel testada apenas com n-hexano. Também foi possível observar que houve um princípio de separação. A Tabela (4.1) apresenta os valores de seletividade ( $\alpha$ ) (Equação 2.5), resolução ( $R_s$ ) (Equação 2.8) e o número de pratos teóricos para cada enantiômero ( $N_i$  e  $N_j$ ) (Equação 2.7).

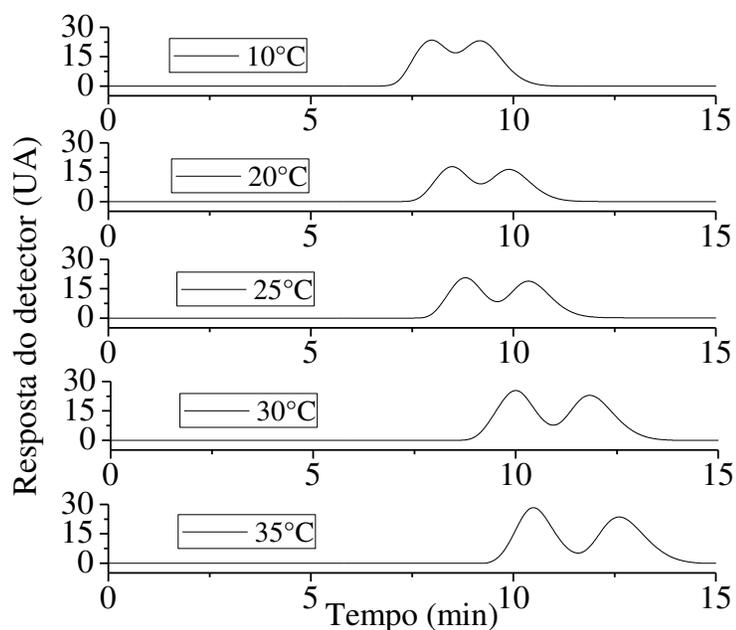
**Tabela 4.2** – Parâmetros cromatográficos para a separação de ibuprofeno racêmico em coluna OD 20  $\mu\text{m}$ .

Fase móvel	$\alpha$	$R_s$	$N_i$	$N_j$
n-hexano (99%) etanol (1%)	1,16	-	-	-
n-hexano (99%) isopropanol (1%)	1,22	-	-	-
n-hexano (99%) n-butanol (1%)	1,24	0,79	442	433

Percebe-se, da Tabela (4.2), que apenas a fase móvel que empregou o etanol não atingiu o valor de seletividade necessário (1,2) para a separação cromatográfica. As

resoluções e os números de pratos teóricos para as fases móveis compostas por etanol ou isopropanol não foram calculadas, pois não houve separação significativa. A resolução e os números de pratos teóricos do sistema que utiliza n-butanol na fase móvel foram calculados, todavia os valores encontrados não atenderam aos mínimos requeridos ( $R_s > 1,5$  e  $N_i > 2000$ ).

Com o objetivo de obter a separação em questão, realizou-se um estudo sobre a influência da temperatura. A fase móvel escolhida para a análise foi a composta por 99% de n-hexano e 1% n-butanol, pois tal fase apresentou o melhor indício de separação. O estudo consistiu separações cromatográficas nas temperaturas de 15° C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. A Figura (4.2) ilustra os resultados obtidos.



**Figura 4.2** – Cromatogramas para injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno racêmico em 5 temperaturas distintas na coluna OD 20 µm. Injeções de 20 µL da solução de 0,5 g L<sup>-1</sup> de ibuprofeno para diferentes temperaturas e vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Na Figura (4.2) nota-se que quanto mais elevado for a temperatura utilizada na separação da mistura racêmica maior é o tempo que os analitos permanecem retidos na

coluna, favorecendo a separação. A Tabela (4.3) apresenta os valores de seletividade, resolução e números de pratos para cada temperatura testada.

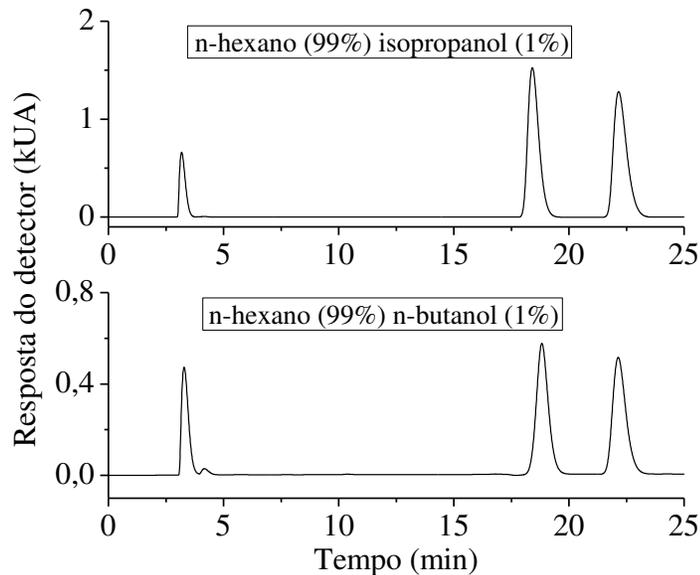
**Tabela 4.3** – Seletividade e resolução da separação de ibuprofeno racêmico para diferentes temperaturas.

Temperatura	$\alpha$	$R_s$	$N_i$	$N_j$
10 °C	1,21	-	-	-
20 °C	1,23	-	-	-
25 °C	1,24	0,79	442	433
30 °C	1,24	0,91	437	472
35 °C	1,26	1,05	504	509

A seletividade de todos os ensaios realizados foram maiores que o mínimo estipulado (1,2). As resoluções, assim como os números de pratos teóricos, para as separações a 10 °C e 20 °C não foram calculadas por não ser possível determinar os valores das larguras dos picos à meia altura devido à separação insuficiente dos compostos. Todos os valores de resolução e números de pratos nas temperaturas de 25 °C, 30 °C e 35 °C não foram suficientes para atender o mínimo estipulado ( $R_s > 1,5$  e  $N_i > 2000$ ). Desta forma, as condições empregadas para a coluna OD 20  $\mu\text{m}$  não atenderam aos requisitos de separação do fármaco.

#### 4.1.2 Coluna OD 5 $\mu\text{m}$

Tendo em vista que não houve separação dentro dos parâmetros desejados ao se utilizar a coluna OD 20  $\mu\text{m}$ , procurou-se uma alternativa. Para tanto, empregou-se a coluna OD 5  $\mu\text{m}$  que possui o comprimento efetivo maior e diâmetro de partícula menor a fim favorecer a separação do fármaco no seletor quiral. As fases móveis e temperatura utilizadas nesta etapa foram baseadas nos melhores resultados do estudo inicial retratados nas Tabelas (4.2) e (4.3). A Figura (4.3) exibe os cromatogramas das duas fases móveis testadas.



**Figura 4.3** – Separação de ibuprofeno racêmico na coluna OD 5  $\mu\text{m}$ . Injeções de 20  $\mu\text{L}$  da solução de 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de ibuprofeno para duas fases móveis distintas na temperatura de 35  $^{\circ}\text{C}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

O primeiro pico nos cromatogramas é o TTBB enquanto que os outros dois são os pares enantioméricos do ibuprofeno. Neste teste, as duas fases móveis apresentaram cromatogramas e tempos de retenções semelhantes, além de aparente separação completa. Os parâmetros cromatográficos seletividade ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ) e número de pratos teóricos ( $N_i$ ) são apresentados na Tabela (4.3) a seguir.

**Tabela 4.4** – Parâmetros cromatográficos para a separação de ibuprofeno racêmico em coluna OD 5  $\mu\text{m}$ .

Fase móvel	$\alpha$	$R_s$	$N_i$	$N_j$
n-hexano(99%) butanol(1%) TFA(0,1%)	1,22	3,37	6197	6759
n-hexano(99%) isopropanol(1%) TFA(0,1%)	1,25	3,82	6260	6843

Todos os parâmetros exibidos na Tabela (4.4) estão acima dos valores requeridos para uma separação cromatográfica ( $\alpha > 1,20$ ;  $R_s > 1,50$  e  $N > 2.000$ ). Ao se comparar as Tabelas (4.2) e (4.4) verifica-se que a seletividade manteve-se praticamente a mesma em ambas as colunas. O aumento do comprimento da coluna e a diminuição do tamanho de partícula elevaram a eficiência da separação de modo suficiente para garantir resolução e os

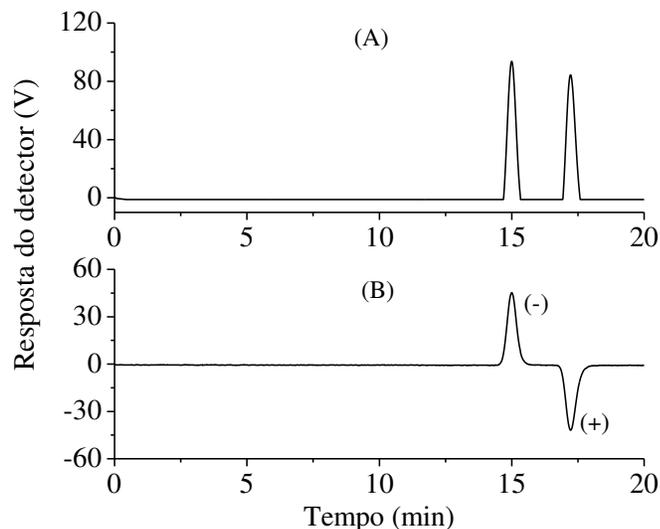
números de pratos teóricos adequados. A coluna OD 5  $\mu\text{m}$  promove o contato do soluto com a fase estacionária sem favorecer o alargamento do picos cromatográficos. Esta segunda coluna estudada apresenta menor influência da dispersão axial, devido ao tamanho reduzido das partículas. Os efeitos de transferência de massa podem ser estudados por meio da abordagem de Van deemter (VAN DEEMTER *et al.*, 1956) e do segundo momento do pulso cromatográfico (RUTHVEN, 1984; ARNOLD *et al.*, 1985; CREMASCO *et al.*, 2001). Ambas as fases móveis apresentaram valores cromatográficos satisfatórios. No entanto, apenas a que utiliza isopropanol foi escolhida, pois este álcool é mais volátil do que o n-butanol, contribuindo para a recuperação dos enantiômeros após a separação.

#### 4.2 Verificação da ordem eluição

A ordem em que os enantiômeros eluem da coluna OD 5  $\mu\text{m}$  foi caracterizada por dicroísmo circular e polarimetria. Sabe-se por meio do fornecedor que os enantiômeros de ibuprofeno são S-(+) e R(-). O espectrômetro de dicroísmo circular utiliza a absorção da luz polarizada no sentido horário ou anti-horário, gerando assim, respostas de sinais positivos ou negativos de acordo com o tipo de polaridade em que o equipamento está configurado, sendo possível a determinação do (+) ou (-) enantiômero (AHUJA, 2000; SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

A Figura (4.4) apresenta dois cromatogramas da separação do ibuprofeno racêmico. O primeiro foi detectado com UV-Vis utilizando arranjo de diodo como apresentado na Figura (4.4A) O segundo empregou dicroísmo circular com a polaridade configurada em negativo, como indicado na Figura (4.4B). A operação foi realizada na temperatura de 25 °C, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de 220 nm, e fase móvel composta por n-hexano e isopropanol (99/1) com 0,1 % de TFA.

O enantiômero menos retido, também chamado de composto *i* neste trabalho, foi detectado com 15 minutos em ambos os detectores e caracterizado como R(-)-ibuprofeno devido ao sinal positivo do detector de dicroísmo circular que estava configurado com a polaridade negativa. O enantiômero mais retido (composto *j*) foi identificado com 17,22 minutos pelos detectores e pode-se constatar que o segundo enantiômero se tratava do S-(+)-ibuprofeno.



**Figura 4.4.** – Cromatograma da separação de ibuprofeno racêmico (25 °C): (A) UV-Vis 220 nm e (B) dicroísmo circular com polaridade negativa.

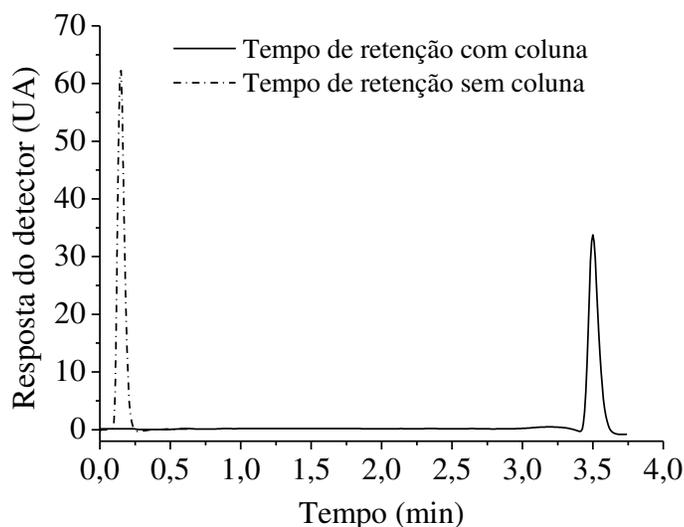
A polarimetria também foi utilizada para caracterizar a eluição dos enantiômeros. Esta técnica consiste em incidir um feixe de luz polarizada no analito e quantificar o ângulo que a luz foi rotacionada. Para a análise, separou-se previamente uma alíquota do composto *i* e *j* na saída da coluna. O volume de cada amostra foi reduzido e determinado nas concentrações de 0,4 g L<sup>-1</sup> para o composto *i* e 1,11 g L<sup>-1</sup> para o composto *j*. Por fim, ambas as amostras foram analisadas no polarímetro no comprimento de onda de 589 nm. O composto mais retido desviou o feixe de luz no sentido horário, sendo caracterizado como o (+)-ibuprofeno, enquanto que o menos retido foi definido como (-)-ibuprofeno desviando o feixe no sentido anti-horário.

Em resumo das duas análises (dicroísmo circular e polarimetria), constatou-se que o composto menos retido é o R-(-)-ibuprofeno e o mais retido é o S-(+)-ibuprofeno na coluna quiral de fase normal. BONATO *et al.* (2003) separaram o ibuprofeno na temperatura de 22 °C com uma coluna de fase reversa Chiralpak AD-RH, utilizando a fase móvel composta por metanol e água na proporção 80/20 e 0,1% de uma solução aquosa de ácido fosfórico a pH 2. A ordem de eluição obtida foi R-(-)-ibuprofeno seguido do S-(+)-ibuprofeno. Esta ordem de eluição também corrobora com DUCRET *et al.*, (1995) em que separaram ibuprofeno racêmico utilizando coluna OD de fase normal da marca da Chiralcel e fase móvel composta por n-hexano e isopropanol.

### 4.3 Determinação da porosidade total e razão entre fases

A determinação da porosidade total na coluna OD 5  $\mu\text{m}$  foi realizada por meio do método do primeiro momento do pulso cromatográfico de acordo com a linearização descrita pela Equação (2.32). O composto inerte utilizado foi o TTBB devido a sua tradição em estudos de colunas recheada com fase estacionária normal (SCHULTE e EPPING, 2005). Neste caso, o tempo de retenção ( $t_R$ ) do composto inerte equivale ao tempo morto do sistema ( $t_M$ ), visto que não há interação do TTBB com a fase estacionária quiral.

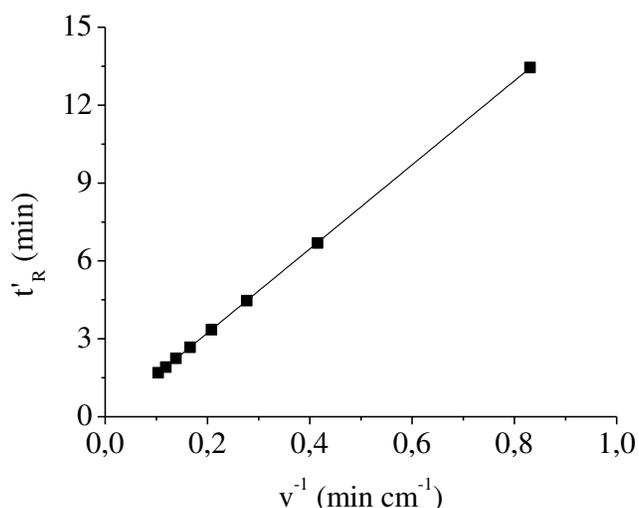
Para a obtenção de dados experimentais foi determinado o tempo da planta ( $t_{plan}$ ) em várias vazões diferentes através de injeções no CLAE sem a coluna. Desta forma, obteve-se o tempo em que o composto leva para percorrer apenas a tubulação do equipamento. As mesmas vazões foram utilizadas para determinar o tempo em que o composto inerte permaneceu retido no CLAE. A Figura (4.5) ilustra o resultado de dois cromatogramas, ambos para a vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ , no qual o intervalo de tempo entre o primeiro pico e o segundo equivale ao tempo em que o TTBB permaneceu retido apenas na coluna cromatográfica. O procedimento empregou as vazões de  $0,2$  até  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  com o passo de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ . No desenvolvimento deste estudo foram obtidos 32 cromatogramas para se determinar a porosidade total da coluna.



**Figura 4.5.** – Injeções de  $20 \mu\text{L}$  da solução de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de TTBB para determinação da porosidade total. Temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

**Tabela 4.5** – Dados para o cálculo da porosidade da Coluna OD 5  $\mu\text{m}$ .

$Q$ ( $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ )	$v$ ( $\text{cm min}^{-1}$ )	$t_{plan}$ (min)	$t_R$ (min)
0,20	1,20	0,52	13,45
0,40	2,41	0,27	6,69
0,60	3,61	0,19	4,47
0,80	4,81	0,15	3,35
1,00	6,02	0,13	2,68
1,20	7,22	0,11	2,24
1,40	8,42	0,10	1,91
1,60	9,63	0,07	1,69



**Figura 4.6** – Determinação da porosidade total utilizando o primeiro momento do pulso cromatográfico.

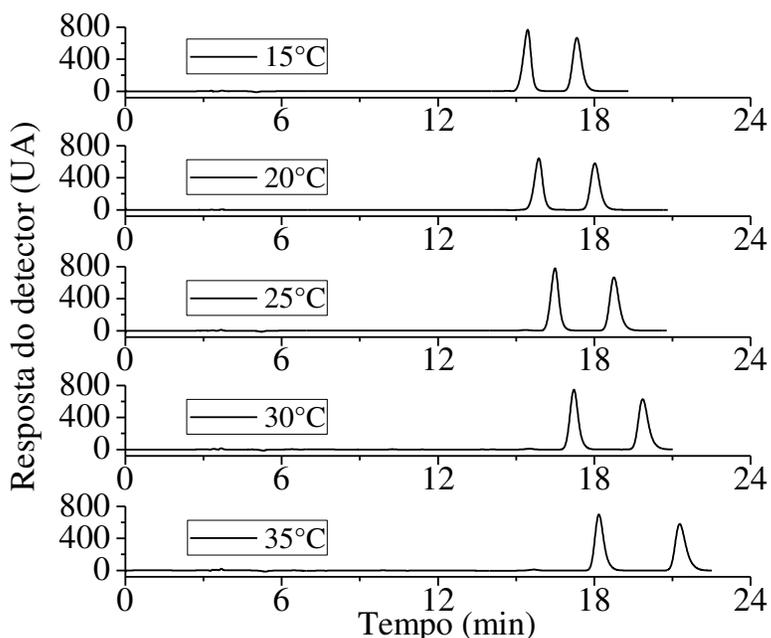
Com o coeficiente angular proveniente da Figura (4.6) e o comprimento da coluna ( $L = 25$  cm) determinou-se a porosidade total de  $0,647 (\pm 0,002)$ . O coeficiente de determinação,  $R^2$ , foi de 0,999. A título de comparação, VIEIRA (2011) obteve o valor de 0,612 para a coluna (150 mm x 4,6 mm) recheada com partículas de 5  $\mu\text{m}$  recobertas com a fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose da marca Chiralcel<sup>®</sup>.

A razão entre fases foi calculada utilizando a relação  $\phi = (1 - \varepsilon_T) / \varepsilon_T$ . O valor obtido para este parâmetro foi de 0,545. MIHLBACHLER *et al.* (2002) encontraram o valor de 0,543 para uma coluna Chiralpak AD empacotada com sílica de 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro e recoberta com o seletor tri (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Apesar de

VIERA (2001) não ter determinado a razão entre fase o valor obtido, de acordo com sua porosidade total, seria de 0,634.

#### 4.4 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

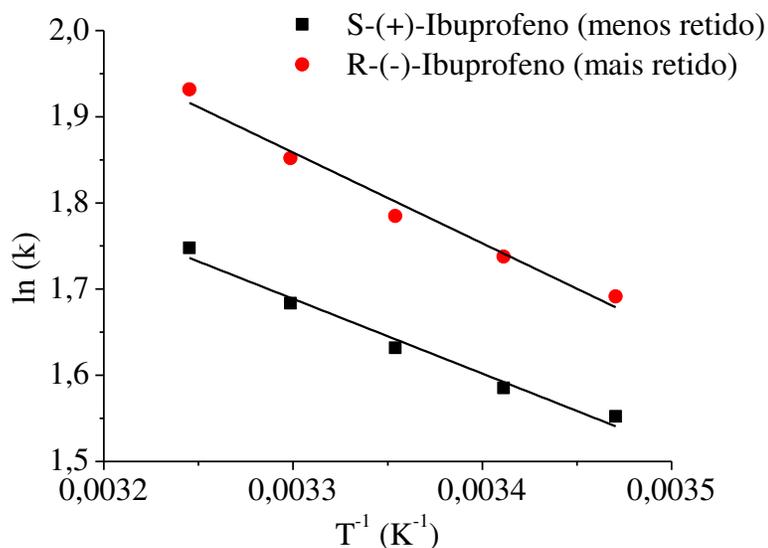
Os parâmetros termodinâmicos do ibuprofeno na fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose foram determinados com base na abordagem cromatográfica da equação de van't Hoff. Na primeira etapa deste estudo, determinou-se a relação linear entre o fator de retenção e a temperatura com a finalidade de obter a variação de entalpia ( $\Delta H^0$ ) e a variação de entropia ( $\Delta S^0$ ) para cada um dos enantiômeros. Em seguida, obteve-se a linearização através da seletividade com a temperatura para calcular a variação da variação de entalpia ( $\Delta\Delta H^0$ ) e variação da variação de entropia ( $\Delta\Delta S^0$ ). Neste estudo foram obtidos 10 cromatogramas para determinar o tempo de retenção dos enantiômeros e 10 para o cálculo do tempo morto. A Figura (4.7) mostra alguns dados gerados que foram necessários para a determinação dos parâmetros termodinâmicos.



**Figura 4.7** – Cromatogramas da análise de van't Hoff. Injeções de 20  $\mu\text{L}$  da solução de 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de ibuprofeno nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Dos cromatogramas da Figura (4.7) nota-se o aumento dos tempos de retenção com o aumento da temperatura. A princípio esta característica é um indício de que as temperaturas empregadas estão acima da temperatura isoenantiosseletiva. Este comportamento, apesar de já relatado para outros sistemas, não é comum para separações quirais como observado por LÄMMERHOFER (2010).

As informações da Figura (4.7) foram linearizadas de acordo com a Equação (2.17). Esta abordagem fornece condições para determinar o  $\Delta H^0$  inerente à interação dos analitos com a FEQ por meio do coeficiente angular, e a variação de entropia ( $\Delta S_i^0$ ) por meio do coeficiente linear juntamente com o auxílio razão entre fases ( $\phi$ ). A Figura (4.8) apresenta as retas de ambos enantiômeros segundo a equação de van't Hoff calculados a partir dos cromatogramas da Figura (4.7). Enquanto que a Tabela (4.6) mostra os parâmetros termodinâmicos obtidos.



**Figura 4.8** – Gráfico de van't Hoff em função do fator de retenção e temperatura.

**Tabela 4.6** – Parâmetros termodinâmicos de adsorção do ibuprofeno racêmico na coluna OD 5  $\mu$ m.

Composto	$\Delta H^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
R-(-)-ibuprofeno	7,21	42,89	0,981
S-(+)-ibuprofeno	8,76	49,40	0,979

Tal abordagem de van't Hoff sugere um comportamento linear, no qual a FEQ não sofre mudanças conformacionais (WAINER E BOOTH, 1996; NASCIMENTO, 2012; PERNA, 2013). Além disso, a linearidade da relação  $\ln(k)$  versus  $T^{-1}$  é uma premissa de que não há presença de múltiplos mecanismos de retenção (WAINER E BOOTH, 1996; PERNA, 2013). O erro decorrente do estudo em duplicata foi de aproximadamente 0,05 kJ mol<sup>-1</sup> para a entalpia e 0,08 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> para a entropia.

De acordo com SCHULTE e EPPING (2005), valores de  $\Delta H^0$  positivos e inferiores a 50 kJ mol<sup>-1</sup>, como os obtidos para ambos enantiômeros, caracterizam adsorção física e endotérmica. LÄMMERHOFER (2010) afirma que na maioria dos casos a abordagem de van't Hoff revela relações lineares com uma forte preferência por fenômenos de adsorção exotérmicos, situação que corrobora com as informações da Tabela (2.2) em que todas as separações apresentadas são exotérmicas.

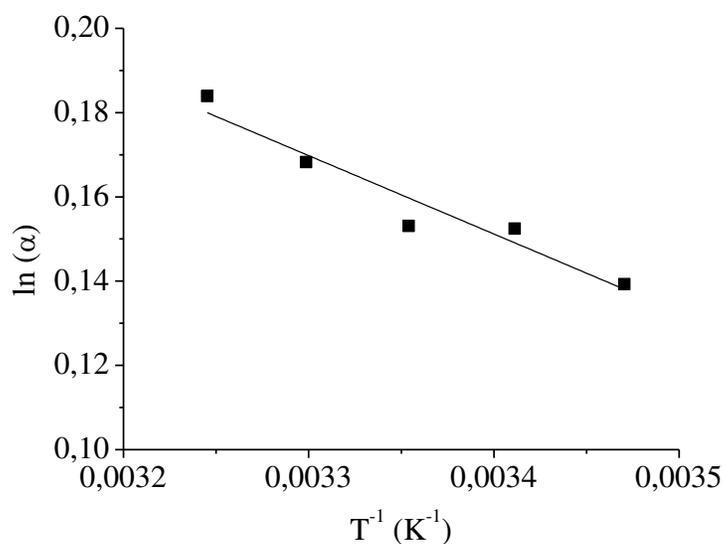
Com relação à variação de entropia, ambos os enantiômeros são solvatados na fase móvel, liberando o mesmo número de moléculas de solvente quando associados com o FEQ. Os valores modulares da variação de entropia obtidos para os enantiômeros do ibuprofeno estão próximos aos observados da Tabela (2.2). É interessante notar que na Tabela (2.2) o termo  $\ln \phi$ , proveniente da razão entre fases, não foi descontado da variação de entropia de adsorção. Se este procedimento fosse adotado para o cálculo das variações de entropias de adsorção do S-(+) e R-(-)-ibuprofeno ambos os enantiômeros apresentariam resultados aproximadamente 10% menores do que os observados na Tabela (4.6). O composto R-(-)-ibuprofeno, por possuir menor valor de  $\Delta S^0$ , indica menor grau de liberdade na fase estacionária. É válido ressaltar que quanto maior for a quantidade de pontos ligantes entre a molécula e a fase estacionária menor é a capacidade da molécula rotacionar (PETER *et al.*, 1998).

A separação do ibuprofeno foi analisada por uma segunda abordagem de van't Hoff para estabelecer as variações das variações de entalpia ( $\Delta\Delta H^0$ ) e de entropia ( $\Delta\Delta S^0$ ) entre os enantiômeros em relação à fase estacionária, e também determinar a temperatura isoenantiosseletiva ( $T_{iso}$ ) que é a temperatura em que a separação não ocorre, podendo também ser a fronteira para outro mecanismo de reconhecimento quiral ou/e inversão quiral. A Figura (4.9) ilustra a linearização de  $T^{-1}$  versus  $\ln(\alpha)$  com os dados provenientes

da Figura (4.7). Enquanto a Tabela (4.7) apresenta os valores obtidos por meio das Equações (2.21) e (2.22).

**Tabela 4.7** – Parâmetros termodinâmicos da separação de adsorção ibuprofeno racêmico na coluna OD 5  $\mu\text{m}$ .

$\Delta\Delta H^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta S^0$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$T_{iso}$ (K)	R <sup>2</sup>
1,55	6,52	237,38	0,936

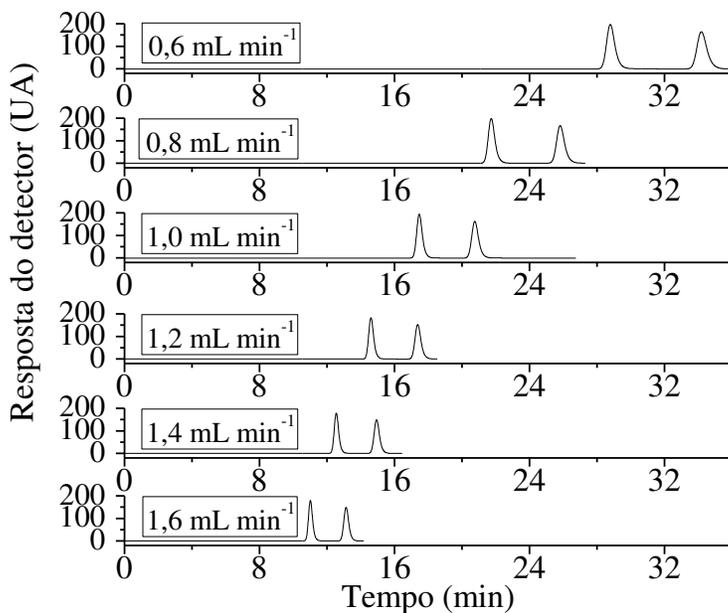


**Figura 4.9** – Gráfico de van't Hoff em função da seletividade e da temperatura.

A  $T_{iso}$  encontrada de 237,38 K (-35,77 °C) é inferior à temperatura usada nas separações inerentes a esta Dissertação. Na literatura, como mostrado na Tabela (2.3), normalmente a temperatura isoenantiosseletiva é elevada e superior à temperatura ambiente. Outro fato peculiar a ser notado na Tabela (4.7) é a maior contribuição entrópica em relação à entálpica nas temperaturas de separação, caracterizando o fenômeno como entropicamente controlada ( $|T\Delta\Delta S^0| > |\Delta\Delta H^0|$ ). LÄMMERHOFER (2010), corroborando com a Tabela (2.3), afirma que na maioria dos casos a separação de compostos quirais é entalpicamente controlada, além disso, ocorre também a diminuição da seletividade com o aumento da temperatura de separação, fato este que não aconteceu na separação do ibuprofeno.

#### 4.5 Determinação da constante de equilíbrio de adsorção linear

As constantes de equilíbrio de adsorção linear, também conhecida como constante modificada de Henry, foram calculadas com base no primeiro momento do pulso cromatográfico. Esta relação linear, como apresentada da Equação (2.31), faz uso apenas da porosidade total e comprimento do leito para a determinação das constantes de equilíbrio. A linearização consiste em relacionar dados de  $v^{-1}$  versus  $\mu_1$ . O termo  $\mu_1$  equivale apenas ao tempo de retenção de cada composto corrigido pelo tempo da planta ( $t_{plan}$ ) e o tempo de injeção ( $t_{inj}$ ). Na determinação fixou-se a temperatura e pulsos de ibuprofeno racêmico foram realizadas em diferentes vazões. A Figura (4.10) ilustra os típicos cromatogramas obtidos para essa análise com os dados gerados para a temperatura de 25 °C. Ao todo foram obtidos 60 cromatogramas.

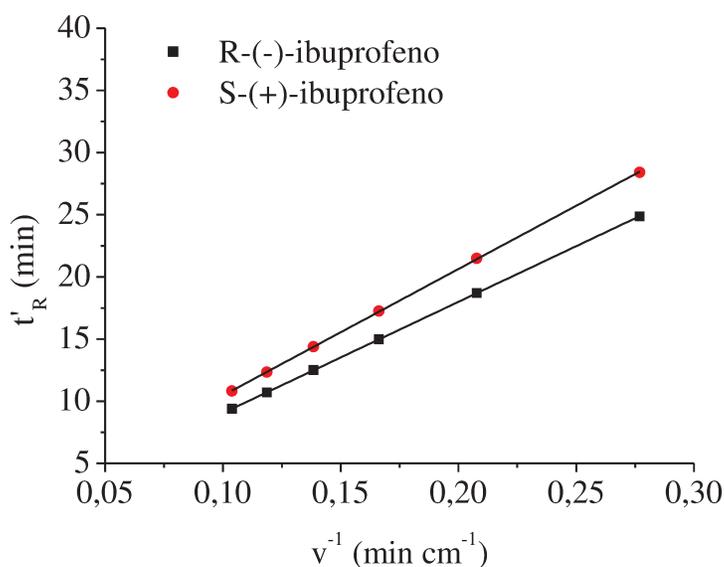


**Figura 4.10** – Cromatogramas da análise do primeiro momento para diferentes vazões. Injeções de 20  $\mu\text{L}$  da solução de 0,15  $\text{g L}^{-1}$  de ibuprofeno na temperatura de 25 °C.

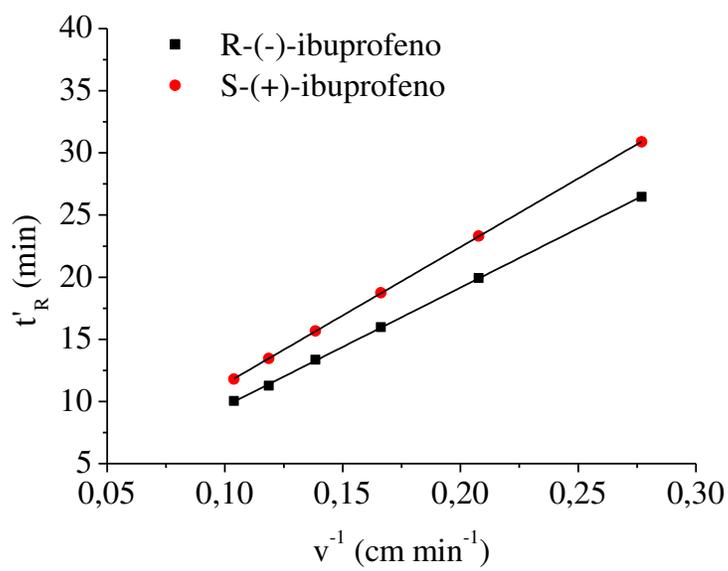
A constante modificada de Henry foi determinada para as temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. A Tabela (4.8) reúne os valores dos tempos de retenção já corrigidos pelo tempo da planta de acordo com a temperatura e velocidade da fase móvel. Nesta tabela o índice subscrito  $i$  faz referência ao composto R-(-)-ibuprofeno, substância menos retida. Enquanto o índice  $j$  é inerente ao composto mais retido, o S-(+)-ibuprofeno. Os dados gerados pela análise do primeiro momento estão representados graficamente nas Figuras (4.11), (4.12), (4.13), (4.14) e (4.15). Os erros nas duplicatas foram de no máximo  $0,06 \text{ min}^{-1}$ .

**Tabela 4.8** – Valores dos tempos de retenção corrido pelo tempo da planta em diferentes velocidades e temperaturas.

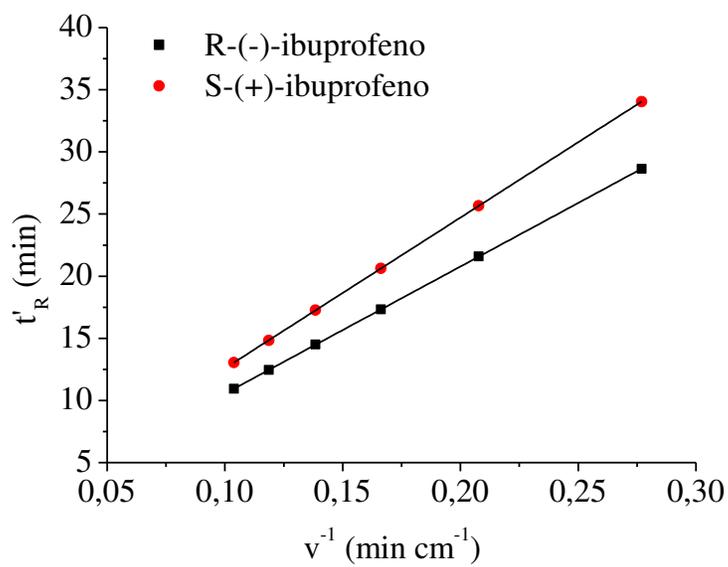
$T$	15 °C		20 °C		25 °C		30 °C		35 °C	
$v^{-1}$ ( $\text{min cm}^{-1}$ )	$t'_{Ri}$ (min)	$t'_{Rj}$ (min)								
0,28	24,87	28,42	26,47	30,88	28,64	34,04	29,01	34,26	31,86	36,91
0,21	18,71	21,49	19,93	23,31	21,58	25,67	21,77	25,70	23,95	27,75
0,17	14,98	17,25	15,97	18,74	17,34	20,63	17,45	20,64	19,22	22,29
0,14	12,49	14,38	13,35	15,67	14,49	17,26	14,54	17,23	16,06	18,62
0,12	10,70	12,33	11,26	13,45	12,45	14,84	12,51	14,90	13,77	15,98
0,10	9,39	10,81	10,03	11,80	10,94	13,06	10,96	13,06	12,10	14,04



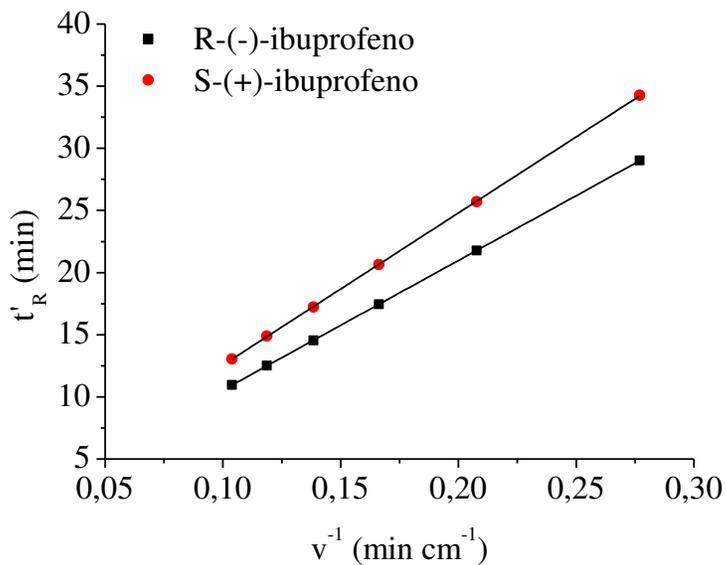
**Figura 4.11** – Análise do primeiro momento para a temperatura de 15 °C.



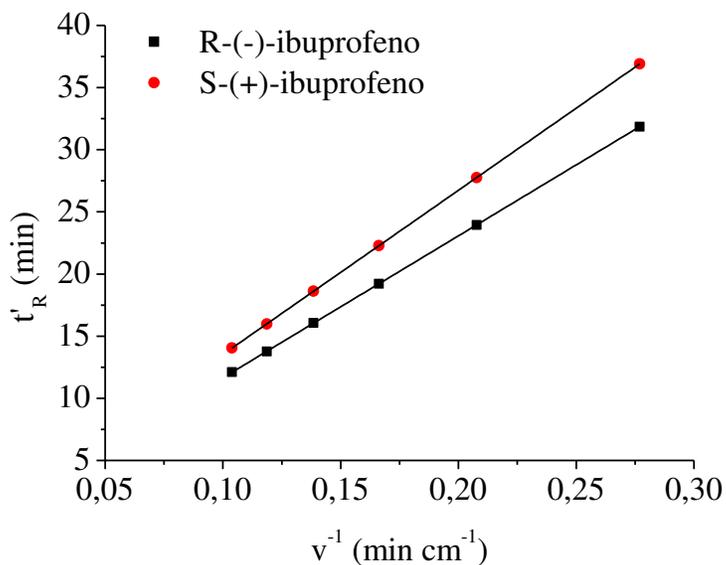
**Figura 4.12** – Análise do primeiro momento para a temperatura de 20 °C.



**Figura 4.13** – Análise do primeiro momento para a temperatura de 25 °C.



**Figura 4.14** – Análise do primeiro momento para a temperatura de 30 °C.



**Figura 4.15** – Análise do primeiro momento para a temperatura de 35 °C.

Os dados dos gráficos foram linearizados para se determinar as constantes de equilíbrio para cada temperatura. Neste cálculo utilizou-se o comprimento da coluna de 25

cm e a porosidade total de 0,647. Na Tabela (4.7) estão resumidos os valores das constantes de equilíbrio para o R-(-)-ibuprofeno ( $K_i$ ) e S-(+)-ibuprofeno ( $K_j$ ).

**Tabela 4.9** – Valores das constantes modificadas de Henry para as temperaturas estudadas.

$T$ (°C)	$K_i$	$K_j$	$R_i^2$	$R_j^2$
15	8,32	9,71	0,999	0,979
20	8,99	10,66	0,999	0,979
25	9,76	11,92	0,999	0,979
30	9,99	12,04	0,999	0,978
35	11,11	13,14	0,999	0,979

A constante de equilíbrio é proporcional ao tempo em que o composto permanece retido na coluna cromatográfica. Pode-se verificar que o S-(+)-ibuprofeno, o composto mais retido, apresenta os valores mais elevados para as constantes de Henry. Outra característica importante é o fato de que quanto mais elevada a temperatura maior é a constante de equilíbrio. Este comportamento não é identificado na maioria das separações cromatográficas onde a constante de equilíbrio diminui com a temperatura visto que este parâmetro é proporcional ao fator de retenção (LÄMMERHOFER, 2010).

A inclinação de uma isoterma linear corresponde à constante de equilíbrio ( $K_i$ ). Metodologias utilizam este parâmetro como informação de entrada para obtenção de modelos matemáticos que descrevem a adsorção não linear. Além disso, as informações da Tabela (4.7) também são necessárias para a determinação de parâmetros de transferência de massa (MIGLIORINI *et al.*, 1998; DA SILVA JR, 2005; RAJENDRAN e CHEN, 2009).



## 5. Conclusões

---

Neste trabalho foram empregados procedimentos para obter parâmetros cromatográficos e de equilíbrio de adsorção linear visando a viabilidade termodinâmica da separação dos enantiômeros S-(+)-ibuprofeno e R-(-)-ibuprofeno. O sistema definido consiste em utilizar o método direto de separação cromatográfica empregando a coluna recheada com sílica recoberta com tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e fase móvel constituída de n-hexano e isopropanol com o aditivo ácido trifluoracético.

Os resultados alcançados nesta Dissertação de Mestrado demonstraram haver seletividade o suficiente para a separação. Com relação à eficiência e resolução, a primeira coluna testada com dimensões de 15 cm comprimento e diâmetro de partículas de 20  $\mu\text{m}$  não apresentou resultados satisfatórios. Este problema foi contornado ao se utilizar uma segunda coluna de comprimento maior (250 mm) e diâmetro de partículas menores (5  $\mu\text{m}$ ), de modo a proporcionar eficiência acima de 6000 pratos teóricos e resoluções acima de 3.

A ordem de eluição dos compostos foi verificada utilizando-se dicróismo circular acoplado no CLAE e polarimetria. Identificou-se que o S-(+)-ibuprofeno é o composto mais retido na coluna, enquanto que o R-(-)-ibuprofeno é o composto que elui primeiro. Desta forma, corroborando com a ordem de eluição observada por DUCRET *et al.*, 1995 e BONATO *et al.*, 2003.

Na caracterização da coluna, foi determinada a porosidade total de 0,647 utilizando o método do primeiro momento do pulso cromatográfico. A razão entre as fases, utilizada na obtenção de parâmetros termodinâmicos, também foi calculada, no qual foi obtido o valor de 0,545.

O estudo dos parâmetros termodinâmicos foi realizado com a abordagem de van't Hoff. O valores de  $\Delta H^0$  do composto mais retido foi de 8,76 kJ mol<sup>-1</sup> enquanto que seu  $\Delta S^0$  foi de 49,40 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. O R-(-)-ibuprofeno obteve 7,21 kJ mol<sup>-1</sup> e 42,89 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> para  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$ , respectivamente. O fenômeno de adsorção foi caracterizado como adsorção física e endotérmica. Logo com o aumento da temperatura ocorre o aumento do tempo de retenção. As variações de entalpia e de entropia entre os compostos mais e menos retidos foram determinadas corroborando para obter a temperatura isoenantiosseletiva de 237,38 K. A temperatura isoenantiosseletiva estava abaixo das temperaturas utilizadas nos experimentos.

Por fim, as constantes de equilíbrio de adsorção linear foram determinadas para 5 temperaturas distintas utilizando o método do primeiro momento do pulso cromatográfico. Estes dados são importantes para a determinação de modelos de isotermas e parâmetros de cinética de transferência de massa.

Em trabalhos futuros relacionados a esta Dissertação sugere-se:

- Estudar a distribuição do ibuprofeno racêmico entre as fases móvel e estacionária em condição de não diluição. Na determinação da isoterma de adsorção pode ser utilizada a análise frontal, método do tempo de retenção binário ou análise frontal por pontos característicos.
- Avaliar a cinética de transferência de massa em colunas semi-preparativas ou preparativas. Para tal, é necessário:
  - A determinação experimentalmente a porosidade total e do leito por meio do primeiro momento do pulso cromatográfico com os compostos inertes TTBB e azul de dextrana.
  - Calcular a porosidade da partícula e a razão entre as fases por meio das porosidades total e do leito.
  - Obter o coeficiente de dispersão axial, coeficiente de transferência de massa, coeficiente de difusão nos poros por meio do método do segundo momento do pulso cromatográfico.

- Realizar separação de ibuprofeno racêmico em escala semi-preparativa ou preparativa analisando o efeito de parâmetros na produtividade, rendimento e pureza dos enantiômeros separados.
- Avaliar a atividade do S-(+)-ibuprofeno em relação à mistura racêmica no organismo.

## Referência Bibliográfica

---

AHUJA, S. *Chiral separations by chromatography*, New York - USA. Oxford University Press, 2000.

AIROLDI, C.; CRITTER, S. A. M. Brazilian red latosol a typic oil as an exchanger: a thermodynamic study involving Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Ca e Na. *Clays and Clay Minerals*, vol. 45, n. 2, p. 125-131, 1997.

ALI, I.; ALAM, S. D.; AL-OTHMAN, Z. A.; FAROOQI, J. A. Recent advances in SPE–chiral-HPLC methods for enantiomeric separation of chiral drugs in biological samples. *Journal of chromatographic science*, v. 51, n. 7, p. 645-654, 2013.

ANDERSSON, S.; ALLENMARK, G. Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 54, n. 1-3, p. 11-23, 2002.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. *Chemical Engineering Journal*, v. 30, n. 2, p. B25-B36, 1985.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. *Química Nova*, v. 6, n. 20, p. 647-656, 1997.

BERTHOD, A. Chiral recognition mechanisms. *Analytical chemistry*, v. 78, n.7, p. 2093-2099, 2006.

BERTHOD, A.; ELE, B. L.; BEESLEY, T. E. Temperature and enantioseparation by macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1060, n. 1-2, p. 205-214, 2004.

BONATO, P. S.; DEL LAMA, M. P. F.; DE CARVALHO, R. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 796(2), 413-420.

BOOTH, T. D.; WAINER, I. W. Mechanistic investigation into the enantioselective separation of mexiletine and related compounds, chromatographed on an amylose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 741, n. 2, p. 205-211, 1996.

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

CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. *Química Nova*, v. 20, n. 1, p. 49-57, 1997.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; GUIOCHON, G. Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, v. 1012, p. 139–149, 2003.

CHERRAK, D. E.; KHATTABI, S.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol, Influence of the mass transfer kinetics. *Journal of Chromatography A*, v. 877, p. 109-122, 2000.

CHESTER, T. L.; COYM, J. W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *Journal of Chromatography A*, v. 1003, n. 1-2, p. 101-111, 2003.

CIRILLI, R.; FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; ZANITTI, L.; LA TORRE, F. A new application of stopped-flow chiral HPLC: inversion of enantiomer elution order. *Journal of Chromatography A*, v. 1061, n. 1, p. 27-34, 2004.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia in COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006, 453p.

CORDATO, D. J.; MATHER, L. E.; HERKES, G. K. Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 649–654, 2003.

COSTA, D.; MOUTINHO, L.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 8, p. 1659-1670, 2006.

COYM, J. Evaluation of ternary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography: Effect of composition on retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 38, p. 5957–5964, 2010.

CREMASCO, M. A. A fronteira da indústria farmacêutica no Brasil: enantiômeros, *Ciência e Cultura*, v. 65, n. 3, p. 4-5, 2013.

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

DA SILVA JR, I. J.; DE VEREDAS, V.; CARPES, M. J. S.; SANTANA, C. C. Chromatographic separation of bupivacaine enantiomers by HPLC: parameters estimation of equilibrium and mass transfer under linear conditions. *Adsorption*, v. 11, n. 2, p. 123-129, 2005.

DANTUS, M. M.; WELLS, M. L. Regulatory issues in chromatographic analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, v. 27, n. 7-9, p. 1413-1442, 2005.

DAVANKOV, V. A. The Nature of Chiral Recognition: Is it a Three-Point Interaction? *Chirality*, v. 9, n. 2, p. 99–102, 1998.

DE PALMA, C.; DI PAOLA, R.; PERROTTA, C.; MAZZON, E.; CATTANEO, D.; TRABUCCHI, E.; CUZZOCREA, S.; CLEMENTI, E. Ibuprofen–arginine generates nitric oxide and has enhanced anti-inflammatory effects. *Pharmacological research*, v. 60, n. 4, p. 221-228, 2009.

DE SOUZA, G. G. Estresse oxidativo e citotoxicidade induzido por ibuprofeno em *Trypanosoma Cruzi*. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 59p. Dissertação de Mestrado.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um Breve Ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, 1998.

DUCRET, A.; TRANI, M.; PEPIN, P.; LORTIE, R. Comparison of two HPLC techniques for monitoring enantioselective reactions for the resolution of (R, S)-ibuprofen: Chiral HPLC vs achiral HPLC linked to an optical rotation detector. *Biotechnology techniques*, v. 9, n. 8, p. 591-596, 1995.

EASSON, L. H.; STEDMAN, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochemical Journal*, v. 27, n. 4, p. 1257, 1933.

FIGUEIREDO, P. L. M. Adsorção de ibuprofeno e ácido clofíbrico em carvões activados. Lisboa: Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2012, 89p. Dissertação de Mestrado.

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

FREITAS, F. A. Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009, 118p. Dissertação de Doutorado.

FREUNDLICH, H. M. F. Uber die adsorption in losungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, v. 57a, p. 385-470, 1906.

GILES, C. H.; MACEWAN, T. H.; NAKHWA, S.N.; SMITH, D. Studies I Adsorption. Part XI. A System of Classification of Solution Adsorption Isotherms, and its Use in Diagnosis of Adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Area of Solids. *Journal of the Chemical Society*. p.3973-3993, 1960.

GONÇALVES, C, v. Separação do racemato n-boc-rolipram pelo processo cromatográfico de leito móvel simulado utilizando fase estacionária quiral tris-{3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005, 120p. Dissertação de Doutorado.

GRAHAM, D. The characterization of physical adsorption systems, I. The equilibrium function and standard free energy of adsorption. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 57, n. 7, p. 665-669, 1953.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1099, p. 1-42, 2005.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Boston: Academic Press, MA, 1994, 701 p.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 27, n. 3-4, p. 357-372, 2002.

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.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 316, p. 53-68, 1984.

JAMES, F.; SEPÚLVEDA, M.; CHARTON, F.; QUINONES, I.; GUIOCHON, G. Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles. *Chemical Engineering Science*, v. 54, p. 1677-1696, 1999.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência in COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006, 453p.

JIANG, J. I.; MINGJI, S.; MINLING, F.; JIAYAN, C. Study on the interaction between membranes and organic solutes by the HPLC method. *Desalination*, v. 71, n. 2, p. 107-126, 1989.

KACZMARSKI, K.; CAVAZZINI, A.; SZABELKI, P.; ZHOU, D.; LIU, X.; GUIOCHON, G. Application of the general rate model and the generalized Maxwell-Stefan equation to the study of the mass transfer kinetics of a pair of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, v. 962, p. 57-67, 2002.

KUBIN, M. Beitrag zur theorie der chromatographie. *Collection Czechoslovak Chemical Communications*, v. 30, no.4, p. 1104-&, 1965.

KUČERA, E. Contribution to the theory of chromatography: Linear non-equilibrium elution chromatography. *Journal of Chromatography A*, n. 19, p. 237-248, 1965.

KÜMMEL, R.; WORCH, E. Adsorption aus Wäßrigen Lösungen, VEB Deutscher Verlag für Grunds-toffindustrie, Leipzig, 1990.

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

LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 6, p. 814-856, 2010.

LÄMMERHOFER, M.; MAIYER, N.; LINDNER W. Enantiomer separations in SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern chromatography. Editora Wiley, 2010, 912p.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE, Campinas-SP: Editora Átomo, 2009, p, 9-12, 64,65.

LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, n. 11, p. 2221-2295, 1916.

LEVAN, M. D.; CARTA, G.; YON, C. M. Adsorption and Ion Exchange in PERRY, ROBERT H. Perry's chemical engineers' handbook, 7.ed, United States of America: McGraw-Hill, 1997.

LEVAN, M. D.; CARTA, G.; YON, C. M. Adsorption and Ion Exchange in PERRY, ROBERT H. Perry's chemical engineers' handbook. 7.ed. United States of America: McGraw-Hill, 1997.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. *Química nova*, v. 20, n. 6, p. 664-664, 1997.

LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

MACHADO, A. C. O. Obtenção de intermediários quirais utilizando lipases em reatores assistidos por membranas. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011, 165 p. Dissertação de Doutorado.

MAIER, N. M.; LINDNER, W. Stereoselective Chromatographic Methods for Drug Analysis in FRANCOTTE, E.; LINDNER, W. Chirality in Drug Research. Editora Wiley 2006, 189.

MEYER, V. R. Practical High-Performance Chromatography, Wiley, 2004, 357p.

MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatographic separation through simulated moving beds under linear and nonlinear conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 827, n. 2, p. 161-173, 1998.

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

MIYABE, K.; CAVAZZINI, A.; GRITTI, F.; KELE, M.; GUIOCHON, G. Moment analysis of mass-transfer kinetics in C18-silica monolithic columns. *Analytical chemistry*, v. 75, n. 24, p. 6975-6986, 2003.

MIYABE, K.; MATSUMOTO, Y.; GUIOCHON, G. Peak parking-moment analysis, A strategy for the study of the mass-transfer kinetics in the stationary phase. *Analytical chemistry*, v. 79, n. 5, p. 1970-1982, 2007.

MOREIRA, J. V. Estudo termodinâmico da região linear das isotermas de adsorção em sílica C<sub>18</sub> para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper hispidinervum* C, CD. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013, 89p. Dissertação de Mestrado.

MOREIRA, J. V.; CREMASCO, M. A.; NASCIMENTO, A. C. Termodinâmica de adsorção dos compostos da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper histidinervum* C, DC em cromatografia líquida de alta eficiência. *XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos – X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, 2013, Foz do Iguaçu-PR.

NASCIMENTO, A. C.; PERNA, R. F.; CREMASCO, M. A.; SANTANA, C. C. Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase. *Adsorption Science & Technology*, v. 30, n. 8, p. 739-750, 2012.

OLIVEIRA, C. E. L.; CREMASCO, M. A. Estudo termodinâmico da retenção cromatográfica de uma mistura binária de carvacrol timol utilizando a técnica cromatográfica de alta eficiência. VII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada, 2013, Uberlândia-MG.

OLIVEIRA, M. A.; BERMUDEZ, J. A. Z.; SOUZA, A. C. M. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada?. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 15, n. 1, p. 99-112, 1999.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PIERONI, J. P.; ANTUNES, A.; BOMTEMPO, J. V. O desafio do financiamento à inovação farmacêutica no Brasil: a experiência do BNDES Profarma, *Revista BNDES*, v. 37, p. 67-90, 2012.

PERNA, R. F. Separação cromatográfica dos enantiômeros do fármaco verapamil em processo contínuo multicolumnas. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013, 158p. Dissertação de Doutorado.

PÉTER, A.; TÖRÖK, G.; ARMSTRONG, D. W.; TÓTH, G.; TOURWÉ, D. Effect of temperature on retention of enantiomers of  $\beta$ -methyl amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 828, n. 1, p. 177-190, 1998.

PIATKOWSKI, W.; ANTOS, D.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Study of the competitive isotherm model and the mass transfer kinetics for a BET binary system. *Journal of Chromatography A*, v. 1003, p. 73-89, 2003.

PIRKLE, W. H.; POCHAPSKY, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chemical Reviews*, v. 89, n. 2, p. 347-362, 1989.

RAJENDRAN, A; CHEN, W. Binary retention time method for rapid determination of competitive Langmuir isotherm parameters. *Separation and Purification Technology*, v. 67, n. 3, p. 344-354, 2009.

RAWAT, J. R.; ANSARI, A. A.; SINGH, R. P. Sorption equilibria of lead (II) on some Indian soils – The natural ion exchangers. *Colloids Surf*, v. 50, p. 207-214, 1990.

RODRIGUES, A. E; LU, Z. P.; LOUREIRO, J. M.; PAIS, L. S. Separation of enantiomers of 1a,2,7,7a-tetrahydro-3-methoxynaphtha-(2,3b)-oxirane by liquid chromatography: laboratory-scale elution chromatography and modelling of simulated moving bed. *Journal of Chromatography A*, v. 702, n. 1, p. 223-231, 1995.

ROJKOVIČOVÁ, T.; LEHOTAY, J.; KRUPČÍK, J.; FEDURCOVÁ, A.; ČIŽMÁRIK, J.; ARMSTRONG, 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. 1653-1671, 2004.

ROSA, P. C. P. Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral kromasil CHI-TBB (0,0-Bis[4-terc-butilbenzoil]-N-N-dialil-L-tartadiamida). Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 116p. Dissertação de Doutorado.

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

SAMUELSSON, J.; SAJONZ, P.; FORNSTEDT, T. Impact of an error in the hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography, I Even a small error can lead to a misunderstanding of the retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, v.1189, p. 19-31, 2008.

SCHNEIDER, P.; SMITH, J. M. Adsorption rate constants from chromatography, *AICHE Journal*, v. 14, n. 5, p. 762-771, 1968.

SCHULTE, M.; EPPING, A. Fundamentals and General Terminology in SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents, Wiley-VCH, 2005, 458p.

- SCRIBA, G. K. *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Humana Press, Ed, 2, 2013.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. *Journal of Chromatography A*, v. 1037, n. 1-2, p. 255–272, 2004.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Thermodynamics of the adsorption of Tröger's base enantiomers from ethanol on cellulose triacetate. *Journal of Chromatography A*, v. 631, n. 1, p. 37-47, 1993.
- SILVA JR, I. J. D.; VEREDAS, V. D.; SANTOS, M. A. G. D.; SANTANA, C. C.; CARPES M. J. S.; CORREIA, C. R. D. Simulated moving bed chromatography in the production of enantiomerically pure or enriched compounds in large scale. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.
- SILVA JR, I. J. Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 87p. Dissertação de Mestrado.
- SILVA JR, I. J. Separação Cromatográfica dos Enantiômeros do Anestésico Bupivacaína e Projeto de Condições de Operação em Leito Móvel Simulado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 189p. Dissertação de Doutorado.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3rd ed,) Wiley, Hoboken, NJ, 2010.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. *Organic Chemistry V*. United States Of America: Library of Congress , 7th edition, 2000. 1272 p.
- SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 13-23, 2001.

TÓTH, J. State equations of the solid-gas interface layers. *Acta Chemica Academiae Scientiarum Hungarica*, v. 69, n. 3, p. 311-328, 1971.

TRATHNIGG, B.; VERONIK, M. A thermodynamic study of retention of poly(ethylene glycol)s in liquid adsorption chromatography on reversed phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1091, n. 1-2, p. 110-117, 2005.

UNGER, K. K.; DU FRESNE VON HOHENESCHE, C.; SCHULTE, M. Columns, Packings and Stationary Phases in SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents, Wiley-VCH, 2005, 458p.

VALDERRAMA, P.; POPPI, R. J. Second order standard addition method and fluorescence spectroscopy in the quantification of ibuprofen enantiomers in biological fluids. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 106, n. 2, p. 160-165, 2011.

VIEIRA, J. P. F. Separação enantiomérica do marcador molecular fmoc-poac por clae em fase estacionária normal e reversa. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011, 110p. Dissertação de Mestrado.

WAINER, I. W. Drug stereochemistry: Analytical methods and pharmacology. *CRC Press*, v. 18, 1993.

WENG, W.; GUO, H.; ZHAN, F.; FANG, H.; WANG, Q.; YAO, B.; LI, S. Chromatographic enantioseparations of binaphthyl compounds on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 1210, n. 2, 178-184, 2008.

WILLIAMS, K.; DAY, R.; KNIHINICKI, R.; DUFFIELD, A. The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochemical pharmacology*, v. 35, n. 19, p. 3403-3405, 1986.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Chromatography A*, v. 906, p. 105-125, 2001.

YOON, J. S.; YOON, D.; OH, J.; KEUN, Y. L.; LEE, H. S.; KOH, Y. Y.; JIN, T. K.; KANG, H. J.; LEE, J. S. The effects and safety of dexibuprofen compared with ibuprofen in febrile children caused by upper respiratory tract infection. *British journal of clinical pharmacology*, v. 66, n. 6, p. 854-860, 2008.

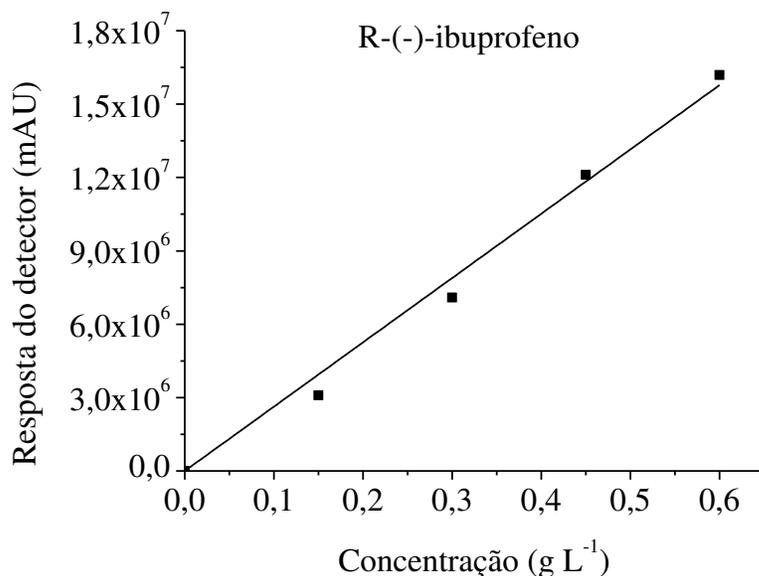
VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 5, n. 6, p. 271-289, 1956.

# Apêndice A

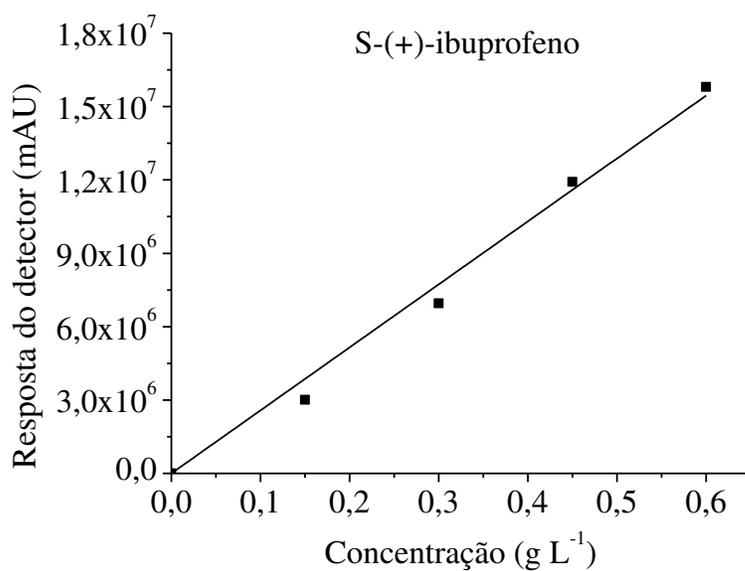
## Curva de calibração para os enantiômeros de ibuprofeno

A curva de calibração é a relação entre a concentração de soluto injetado no cromatograma e a área do pico resultante. Esta ferramenta foi utilizada neste trabalho para determinar a concentração de ibuprofeno na análise de polarimetria.

Na obtenção da curva de calibração foram injetadas as concentrações de 0,15, 0,30, 0,45 e 0,6 g L<sup>-1</sup> e determinadas as respectivas áreas dos picos gerados. As soluções foram preparadas com a fase móvel composto por 99% de n-hexano e 1% de isopropanol. O TFA foi empregado como aditivo, sendo usado na proporção de 0,1% do volume total da fase móvel. O detector UV-Vis foi ajustado em 220 nm. A temperatura empregada foi de 15 °C, pois em baixas temperaturas os enantiômeros eluem em menos tempo. As Figuras (A1) e (A2) são as curvas de calibração obtidas para o S-(+)-ibuprofeno e R-(-)-ibuprofeno.



**Figura A1** – Curva de calibração do R-(-)-ibuprofeno.



**Figura A2** – Curva de calibração do S-(+)-ibuprofeno.

Os coeficientes angulares provenientes das Figuras (A1) e (A2) estão resumidos na Tabela (A1).

**Tabela A1** – Coeficiente angular da curva de calibração.

	Coeficiente angular	R <sup>2</sup>
R-(-)-ibuprofeno	2,627 x 10 <sup>7</sup>	0,996
S-(+)-ibuprofeno	2,576 x 10 <sup>7</sup>	0,996