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

Dissertação de Mestrado

RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DO SECNIDAZOL

Ana Carolina Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química na Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Campinas – São Paulo
Junho de 2012

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

N17r

Nascimento, Ana Carolina
Resolução enantiomérica do secnidazol / Ana Carolina Nascimento. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Quiralidade. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Enantiômeros. 4. Antiparasitários. 5. Análise cromatográfica. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Enantiomeric resolution of secnidazole
Palavras-chave em Inglês: Chirality, High performance liquid chromatography, Enantiomers, Antiparasitic agents, Chromatographic analysis
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
Titulação: Mestra em Engenharia Química
Banca examinadora: Amaro Gomes Barreto Júnior, Marco Aurélio Cremasco
Data da defesa: 29/06/2012
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

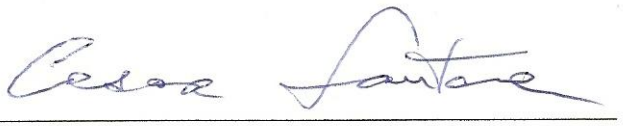
Dissertação de Mestrado defendida por Ana Carolina Nascimento e aprovada em 29 de Junho de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. – Cesar Costapinto Santana
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior
Escola de Química - UFRJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Ana Carolina Nascimento e aprovada em 29 de Junho de 2012.



Prof. Dr. – Cesar Costapinto Santana

Orientador

A Deus por fazer da minha vida uma vitória a cada novo dia;
Ao meu esposo Gean pelo amor, incentivo e compreensão;
À minha mãe, Ivonete, minha amiga e maior incentivadora;
Aos meus irmãos, Camila e Claigton, e minha sobrinha Heloísa,
por colorirem minha vida!

Agradecimentos

Agradeço a Deus, autor da minha vida, por sempre estar ao meu lado, iluminar meu caminho, me permitir sonhar, me dar forças para continuar lutando pelos meus objetivos e por me auxiliar a manter inabalável a minha fé de que tudo acabará bem, mesmo com a iminência de grandes dificuldades. Obrigada Senhor!

Ao meu amado esposo Gean, por ter deixado seus sonhos de lado para sonhar comigo, pelo amor incondicional e por sempre acreditar em mim!

Aos meus pais Severiano e Ivonete, e em especial à minha mãe, pelo amor, amizade, incentivo e por sempre se orgulhar das minhas conquistas. Aos meus irmãos Camila e Claigton, e à minha sobrinha Heloísa, pelo amor e por iluminarem minha vida.

À minha tia Elenice e minha prima Larissa pelo amor e incentivo. A toda minha família pelo apoio e compreensão, mesmo estando tão distante. Eu amo todos vocês!

Ao professor Cesar Costapinto Santana pela oportunidade concedida para realização do mestrado, pela paciência e pela orientação.

Ao professor Marco Aurélio Cremasco pela orientação e valiosa ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor Antônio Carlos Luz Lisbôa pela amizade, generosidade e atenção.

Ao professor Carlos Roque Duarte Correia pela generosidade e pelos ensinamentos.

A todos os professores da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas por todo conhecimento transmitido.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à Regina e à Maria Luiza pela paciência e atenção.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biosseparações: Rafael Perna, Luisa Sepúlveda, Absolon Carvalho, Alex Martins, Jean Moreira, Airton Salles e João Paulo Vieira pela agradável convivência e pelo tempo dispensado na busca de soluções para os problemas que surgiram no decorrer dos experimentos. Em especial às minhas grandes amigas Anayla Sousa e Carla Aiolfi pelo apoio, pelas risadas durante o trabalho e por deixarem meus dias mais coloridos! Vocês moram no meu coração.

Aos meus amigos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas: Ricardo Assis dos Santos, Carolina Camerin, Hildo Sena, Carlos Oliveira e Rodrigo Amaral por alegrarem minha rotina diária nos intervalos de trabalho.

Aos meus preciosos amigos de Telêmaco Borba – PR, que mesmo estando distante conseguiram transmitir carinho e energia positiva para eu chegar até aqui! Em especial à Andriéli Bueno e à Tatiane Morski, minhas irmãs de coração!

Ao pessoal da Igreja Presbiteriana de Barão Geraldo pelo apoio e carinho. Em especial à Dona Nelly e à Elione pelo cuidado, carinho e momentos de oração.

Aos amigos que conquistei durante minha estadia em Campinas: Thaís Almeida e Vinícius de Veredas.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro ao longo do mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Os segredos das ciências foram dados aos homens para seu progresso, mas jamais ele poderá ultrapassar os limites estabelecidos por Deus."

(Allan Kardec)

Resumo

O secnidazol corresponde à formulação 1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol e possui espectro de atividade contra microorganismos anaeróbicos e eficácia no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. Ele é comercializado na forma racêmica, isto é, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R e S. Não é oficial em nenhuma farmacopeia. Estudos relatam que para alguns imidazóis o enantiômero R apresenta maior atividade biológica frente ao enantiômero S. Portanto a separação do secnidazol é importante para testes biológicos comparativos de efeitos colaterais. Inserindo-se neste contexto, foi desenvolvido este trabalho de pesquisa com o intuito de estudar a resolução enantiomérica do fármaco secnidazol pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna recheada com fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Experimentos de pulsos com soluções diluídas foram realizados variando a vazão de fase móvel de 1,0 a 2,5 mL/min e as temperaturas de 20 a 35°C. Os resultados mostraram alta eficiência, com número de pratos superando 1000 e fatores de separação na ordem de 7,0. Os valores negativos de $\Delta H°$ e ΔS^* indicam que a adsorção dos enantiômeros da fase móvel na fase estacionária é entalpicamente favorável. Experimentos a altas concentrações (condições de sobrecarga) foram realizados com a finalidade de determinar as isotermas não-lineares pelo método da análise frontal e também os perfis de eluição sob estas condições. As isotermas de adsorção apresentaram comportamento não-linear e o modelo de Langmuir foi bem correlacionado aos dados experimentais de equilíbrio no intervalo de concentração analisado. A partir da metodologia *shortcut* foram obtidos os parâmetros operacionais da unidade leito móvel simulado. As purezas alcançadas para as correntes de extrato e refinado foram 85,50% e 72,50%, respectivamente.

Palavras-chave: secnidazol, cromatografia líquida de alta eficiência, enantiômeros, parâmetros cromatográficos.

Abstract

The chemical formula of secnidazole is 1-(hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole. It acts activity against anaerobic microorganisms and is effective in the treatment of amebiasis, giardiasis, trichomoniasis, and bacterial vaginosis. It is marketed in the racemic form, that is, proportion 1:1 of their R and S-enantiomers. It's not officially recognized by any pharmacopoeia. Studies have reported that for some imidazoles the R-enantiomer has a higher biological activity than the S-enantiomer. For this reason the separation of secnidazole is important for comparative biological tests of side effects. It is in this context that this research was developed in order to study the enantiomeric resolution of drug secnidazole by the technique of high performance liquid chromatography using stationary phase column packed with amylose tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate). Pulse experiments with dilute solutions were conducted by varying the mobile phase flow (1.0 to 2.5 mL/min) and temperature (20 to 35 °C). The results revealed high efficiency, with number of plates overcoming 1000 and selectivities in the order of 7.0. The negative values of $\Delta H°$ and ΔS^* indicates that the enantiomer adsorption from the mobile phase to stationary phase is enthalpically favorable. Experiments in overloaded conditions were realized to obtain the equilibrium adsorption isotherms by frontal analysis, as well overload elution profiles. The adsorption isotherms shown a nonlinear behavior and the Langmuir model was well correlated to equilibrium experimental data in the range of investigated concentration. From the shortcut method operating parameters were obtained to the simulated moving bed unit. The purities reached for the extract and raffinate lines were 85.50% and 72.50% , respectively.

Keywords: secnidazole, high performance liquid chromatography, enantiomers, chromatographic parameters.

Sumário

Resumo **ix**

Abstract **x**

Lista de Figuras **xv**

Lista de Tabelas **xix**

Nomenclatura **xxi**

Capítulo 1 – Introdução **1**

1.1. Motivação para o trabalho 4

1.2. Objetivos 5

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica **6**

2.1. Fundamentos de estereoquímica 6

2.1.1. Introdução 6

2.1.2. Estereoquímica 7

2.1.3. Enantiômeros 9

2.1.4. Quiralidade 9

2.2. Fármacos com espectro de atividade contra bactérias e protozoários anaeróbios 12

2.2.1. Introdução 12

2.2.2. Fármacos nitroimidazóis 12

2.2.3. Secnidazol 14

2.2.3.1. Determinação da configuração absoluta do secnidazol 16

2.3. Fármacos quirais 18

2.3.1. Tendências no desenvolvimento de fármacos quirais 21

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência 25

2.4.1. Cromatografia quiral 27

2.4.2. Fase móvel 28

2.4.3. Fases estacionárias quirais 29

2.4.3.1. Fases estacionárias quirais bBaseadas em polissacarídeos 30

2.5. Características da coluna cromatográfica quiral 32

2.5.1. Método dos momentos 33

2.5.2. Porosidade 34

2.6. Parâmetros cromatográficos 35
2.6.1. Tempo de retenção 36
2.6.2. Fator de retenção 36
2.6.3. Fator de separação 36
2.6.4. Resolução 37
2.6.5. Número de pratos 37
2.7. Altura equivalente a um prato teórico (HETP) 37
2.8. Isotermas de adsorção 42
2.8.1. Modelo de Langmuir 44
2.8.2. Método por análise frontal 45
2.9. Análise termodinâmica de adsorção 48
2.10. Sobrecarga da coluna 50
2.11. Cromatografia preparativa em leito móvel simulado 51
2.11.1. Projeto das condições de operação do leito móvel simulado 55
2.11.1.1. Método *shortcut* ou do atalho 56
Capítulo 3- Materiais e Métodos 58
3.1. Materiais 58
3.1.1. O secnidazol 58
3.1.2. Traçador 59
3.1.3. Fase estacionária 60
3.1.4. Fase móvel 62
3.1.5. Aparelhagem experimental 62
3.1.5.1. Cromatógrafo líquido 62
3.1.5.2. Unidade leito móvel simulado 63
3.2. Métodos 64
3.2.1. Desenvolvimento da separação cromatográfica 65
3.2.1.1. Definição e *screening* da fase móvel 66
3.2.1.2. Análise de resposta do sistema de detecção 66
3.2.1.3. Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica 67
3.2.2. Experimentos com soluções diluídas 67
3.2.2.1. Determinação da porosidade total 67
3.2.2.2. Determinação dos parâmetros cromatográficos 68

3.2.2.3. Determinação das constantes de Henry 69
3.2.2.4. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa 70
3.2.2.5. Análise termodinâmica de adsorção 70
3.2.3. Experimentos com soluções concentradas 71
3.2.3.1. Estudo de sobrecarga da coluna 71
3.2.3.2. Determinação das isotermas de adsorção pelo método de análise frontal 71
3.2.3.3. Obtenção dos parâmetros para separação em leito móvel simulado 72
Capítulo 4 -Resultados e Discussões 73
4.1. Experimentos para desenvolvimento do método de separação cromatográfico 73
4.1.1. Avaliação da resposta do sistema de detecção 73
4.1.2. Seleção da fase estacionária 74
4.1.3. Seleção e *screening* da fase móvel 75
4.2. Ordem de eluição 78
4.3. Experimentos com soluções diluídas 79
4.3.1. Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação 79
4.3.1.1. Cromatogramas 83
4.3.2. Determinação da porosidade total 85
4.3.3. Determinação da constante de Henry 86
4.3.4. Eficiência de separação e coeficientes de transferência de massa 87
4.3.5. Análise termodinâmica de adsorção 91
4.4. Experimentos com soluções concentradas 94
4.4.1. Estudo da sobrecarga da coluna 94
4.4.2. Isotermas de adsorção 96
4.4.3. Cromatografia preparativa em leito móvel simulado 100
4.4.3.1. Obtenção dos parâmetros para separação pelo método *shortcut* 100
4.4.3.2. Resultados experimentais 104
4.4.3.2.1. Perfis dos detectores UV e polarímetro 105
4.4.3.2.2. Purezas enantioméricas 106

4.4.3.2.3. Tabela-resumo da separação do secnidazol em LMS 107

Capítulo 5 - Conclusões 109

Capítulo 6 - Atividades Futuras 111

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas 112

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Representação esquemática de moléculas quirais 7

Figura 2.2 - Classificação dos isômeros 9

Figura 2.3 - Quiralidade 10

Figura 2.4 - Molécula de hexaheliceno 11

Figura 2.5 - Estruturas químicas dos nitroimidazóis 14

Figura 2.6 - Estrutura química do secnidazol 15

Figura 2.7 - Regra de Kazlauskas para a enantiopreferência da lipase da *Pseudomonas sp* 16

Figura 2.8 - Preparação do derivado R-(-)-5 correspondente ao R-(-)-sec 17

Figura 2.9 - Estrutura cristalina do composto R-(-)-5 17

Figura 2.10 - Ligação estereosseletiva de enantiômeros de um fármaco quiral 19

Figura 2.11 - Distribuição de medicamentos aprovados em todo o mundo de acordo com o caráter de quiralidade no período 1983-2002 22

Figura 2.12 - Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA 23

Figura 2.13 - Esquema de um sistema de CLAE 26

Figura 2.14- Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento quiral 28

Figura 2.15 - Estruturas tridimensionais de amilose e celulose 31

Figura 2.16 - Estruturas estruturas químicas dos polímeros de (a) celulose e (b) amilose 31

Figura 2.17 – Cromatograma teórico com as medidas para determinar os parâmetros cromatográficos 35

Figura 2.18 – Alargamento do pico cromatográfico a partir de diversos caminhos do fluxo 39

Figura 2.19 – Difusão longitudinal devido à difusão do soluto para as extremidades de concentração mais baixa 39

Figura 2.20 – Transferência de massa – efeito do tamanho da partícula e viscosidade da fase móvel 40

Figura 2.21 – Curva de van Deemter hipotética 40

Figura 2.22 – Perfil de eluição de um único componente obtido pelo método da análise frontal 46

Figura 2.23 – Perfil de eluição de uma mistura binária obtido pelo método da análise frontal 47

Figura 2.24 - Diagrama esquemático de operação do sistema leito móvel verdadeiro (LMV). (●) Composto menos retido – refinado; (■) Composto mais retido – extrato 53

Figura 2.25 – Perfis de concentração obtidos por testes de pulso longo. (A) componente mais retido; (B) componente menos retido 57

Figura 3.1 – Estrutura química do secnidazol 59

Figura 3.2 – Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB) 60

Figura 3.3 –Estrutura química da fase estacionária quiral tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose 61

Figura 3.4 – Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência 63

Figura 3.5- Unidade leito móvel simulado: (A) visão externa; (B) visão interna 64

Figura 3.6 – Sequência de experimentos em uma única coluna para obtenção das condições operacionais 65

Figura 4.1 – Espectro de varredura da solução de secnidazol racêmico 74

Figura 4.2 – Representação das ligações supra-moleculares do secnidazol nas ranhuras quirais da fase estacionária tris-(3-5-dimetilfenilcarbamato) de amilose 75

Figura 4.3 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 100% acetonitrila 76

Figura 4.4 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 90% acetonitrila e 10% isopropanol 76

Figura 4.5 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 80% acetonitrila e 20% isopropanol 77

Figura 4.6 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% acetonitrila e 40% isopropanol 77

Figura 4.7 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% isopropanol e 40% acetonitrila 78

Figura 4.8 – Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol, na fase móvel isopropanol:acetonitrila (60:40, v/v) 79

Figura 4.9- Variação da resolução com a vazão para as temperaturas: (■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C 82

Figura 4.10- Variação da resolução com a temperatura para as vazões: (■)1,0 mL/min; (■)1,5 mL/min; (■)2,0 mL/min; e (■)2,5 mL/min 83

Figura 4.11 – Perfil de eluição do composto inerte TTBB 84

Figura 4.12 – Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol a 20°C 85

Figura 4.13 - Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB a 20°C 86

Figura 4.14 – Variação das constantes de Henry para as temperaturas: (■ e □) 20°C; (■ e □) 25°C; (■ e □) 30°C e (■ e □) 35°C 87

Figura 4.15 -Curva de van Deemter para o R-(-)-sec a:(■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C 89

Figura 4.16-Curva de van Deemter para o S-(+)-sec a:(■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C 89

Figura 4.17- Dependência do fator de retenção k com a temperatura para o R-(-)-secnidazol a 1,0 mL/min 91

Figura 4.18- Dependência do fator de retenção k com a temperatura para o S-(+)-secnidazol a 1,0 mL/min 92

Figura 4.19- Dependência do fator de separação (α) com a temperatura para os enantiômeros do secnidazol a 1,0 mL/min 92

Figura 4.20 –Cromatograma do secnidazol racêmico em condições de sobrecarga 95

Figura 4.21 - Curvas de ruptura para a mistura racêmica do secnidazol para $C_{mistura}$= 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/ml 97

Figura 4.22- Derivada das curvas de ruptura apresentadas na Figura 4.21 97

Figura 4.23- Análise das coletas realizadas durante a eluição 98

Figura 4.24- Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do secnidazol 99

Figura 4.25- Isotermas de adsorção dos enantiômeros do secnidazol obtidas pelo método da análise frontal 99

Figura 4.26 – Perfil de eluição para a mistura racêmica do secnidazol para $C_{mistura}$= 2,50 mg/ml, Q= 3,00 mL/min, FM= 60% IPA: 40% ACN, T= 25°C e λ= 380 nm 101

Figura 4.27- Perfil de concentração dos enantiômeros do secnidazol 101

Figura 4.28- Velocidade da onda de choque (u_{sh}) (▲e■)e comprimento da zona de TM (L_{ZTM}) (▲e■)vs vazão (m^3/s) para obtenção de $x_{n=4}$ e $y_{n=4}$ onde ▲R-(-)-secnidazol e ■S-(+)-secnidazol 102

Figura 4.29- Velocidade da onda de difusão (u_D) vs vazão (m^3/s) para obtenção de $x_{5\ e\ 6}$ e $y_{5\ e\ 6}$ onde ▲R-(-)-secnidazol e ■S-(+)-secnidazol 103

Figura 4.30- Alimentação dos parâmetros operacionais do leito móvel simulado 104

Figura 4.31 – Perfis do UV e do polarímetro no ciclo 08 105

Figura 4.32 – Cromatograma obtido para análise da pureza do enantiômero R-(-)-secnidazol na corrente de refinado 106

Figura 4.33 – Cromatograma obtido para análise da pureza do enantiômero S-(+)-secnidazol na corrente de extrato 107

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Diferentes propriedades fisiológicas dos enantiômeros de alguns fármacos 21

Tabela 2.2 - *Top* 10 dos terapêuticos mais vendidos nos EUA em 2009 24

Tabela 2.3 - Seletores quirais e principais interações com analitos quirais 29

Tabela 4.1 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 1,0 mL/min 80

Tabela 4.2 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 1,5 mL/min 80

Tabela 4.3 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 2,0 mL/min 80

Tabela 4.4 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 2,5 mL/min 81

Tabela 4.5 – Resultado da porosidade total a diferentes vazões e temperaturas 86

Tabela 4.6 – Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas 88

Tabela 4.7 – Parâmetros A e C da equação de van Deemter para os enantiômeros do secnidazol 90

Tabela 4.8 – Valores de D_L / u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros do secnidazol 90

Tabela 4.9 – Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do secnidazol 93

Tabela 4.10 – Tempos de inflexão dos picos cromatográficos no estudo de sobrecarga em coluna semi-preparativa Chiralpak® AD 96

Tabela 4.11– Parâmetros do modelo de Langmuir 100

Tabela 4.12–Vazões das zonas de transferência de massa calculadas através do método *shortcut* 103

Tabela 4.13– Vazões das zonas de transferência de massa calculadas através do método *shortcut* 104

Tabela 4.14– Tabela dos parâmetros operacionais da separação dos enantiômeros do secnidazol em leito móvel simulado 108

Nomenclatura

Letras Latinas

A	Coeficiente da equação de van Deemter (cm) referente a difusão turbilhonar
a_i	Constante de distribuição
B	Coeficiente da equação de van Deemter (cm^2/min) referente a difusão longitudinal
b_i	Constante de equilíbrio de adsorção do componente i
C	Coeficiente da equação de van Deemter (cm) referente à transferência de massa
c_i	Concentração do componente i na fase líquida (mg/mL)
$c_{i,a}$	Concentração do componente i na alimentação da coluna (mg/mL)
$c_{i,b}$	Concentração do componente i na segunda frente de adsorção (mg/mL)
$c_{i,pi}$	Concentração do componente i no platô intermediário (mg/mL)
d_p	Diâmetro da partícula (cm)
D	Diâmetro da coluna (cm)
D_L	Coeficiente de dispersão axial
D_m	Difusividade molecular
$HETP$	Altura equivalente a um prato teórico
He_i	Constante de Henry
k_i	Fator de retenção
k_m	Coeficiente de transferência de massa global
L	Comprimento da coluna (cm)
L_{ztm}	Comprimento das zonas de transferência de massa (m)
M	Massa molecular (g/mol)
N_{pi}	Número de pratos teóricos
q_i	Concentração do soluto i na fase estacionária (mg/mL)
q_s	Capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos
Q	Vazão volumétrica (mL/min)
Q_F	Vazão de alimentação (mL/min)
Q^I	Vazão na zona 1 (mL/min)
Q^{II}	Vazão na zona 2 (mL/min)
Q^{III}	Vazão na zona 3 (mL/min)
Q^{IV}	Vazão na zona 4 (mL/min)
R	Constante universal dos gases ideais = 8,314472 J/ Kmol
Rs	Resolução do sistema
$t_{5\%}$	Tempo a 5% do platô de concentração (min)

$t_{95\%}$	Tempo a 95% do platô de concentração (min)
t	Tempo (min)
$t_{\inf}$	Tempo de inflexão (min)
t_{inj}	Tempo de injeção (min)
t_M	Tempo de retenção de um composto não retido
t_{Ri}	Tempo de retenção do componente i (min)
t^*	Tempo de troca (min)
T	Temperatura (°C, K)
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade (K)
u	Velocidade superficial da fase móvel (cm min^{-1})
u_*	Velocidade intersticial da fase móvel (cm min^{-1})
u_D	Velocidade de onda de difusão (m/s)
u_{sh}	Velocidades de onda de choque (m/s)
V	Volume (mL)
V_0	Volume morto da coluna (mL)
V_1	Volume de retenção da primeira frente de adsorção (mL)
V_{1+2}	Volume de retenção da segunda frente de adsorção (mL)
$V_{1,des}$	Volume de retenção da primeira frente de dessorção (mL)
V_{ads}	Volume de adsorvente (mL)
V_C	Volume da coluna (mL)
V_M	Volume de retardamento da fase móvel (mL)
V_T	Volume morto total (mL)
w_h	Largura dos picos a meia-altura (cm)
ΔG°	Variação da energia de Gibbs (J/mol)
ΔH°	Entalpia molar de adsorção (KJ/mol)
ΔS°	Entropia molar de adsorção (J/mol)
$\Delta(\Delta G°)$	Variação da energia de Gibbs (J/mol)
$\Delta(\Delta H°)$	Variação da entalpia de adsorção (KJ/mol)
$\Delta(\Delta S°)$	Variação da entropia de adsorção (J/mol)

Letras Gregas

σ^2	Segundo momento
α	Fator de separação (seletividade)
ε	Porosidade do leito
ε_p	Porosidade da partícula
ε_T	Porosidade total do leito
λ	Comprimento de onda (nm)

μ_1	Primeiro momento absoluto
μ_2	Segundo momento central
μ	Primeiro momento (min)
γ_1	Constante da equação da dispersão axial
γ_2	Constante da equação da dispersão axial
υ	Velocidade superficial (m/s)
ϕ	Coeficiente de associação do solvente

Abreviaturas

ACN	Acetonitrila
AF	Análise frontal
AFPC	Análise frontal por pontos característicos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EPC	Eluição por pontos característicos
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
IPA	Isopropanol
LMS	Leito móvel simulado
LMV	Leito móvel verdadeiro
MI	Método inverso
MP	Método da pertubação
TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
UOP	Universal oil products
UV-Vis	Ultravioleta- visível

Capítulo 1

1. Introdução

A quiralidade é uma característica proeminente dos sistemas biológicos, presente desde as moléculas aos seres humanos e inerente a quase todos os processos bioquímicos e fisiológicos. A questão da quiralidade tornou-se cada vez mais importante no processo de pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de novos fármacos (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002).

De acordo com MAIER et al. (2001) a natureza quiral dos sistemas vivos tem implicações evidentes em compostos biologicamente ativos que interagem com eles. Em nível molecular, quiralidade representa uma propriedade intrínseca dos "blocos de construção da vida", tais como aminoácidos e açúcares, e portanto, de peptídeos, proteínas e polissacarídeos. Como conseqüência, os processos metabólicos e reguladores mediados por sistemas biológicos são sensíveis à estereoquímica e respostas diferentes podem ser freqüentemente observadas quando se comparam as atividades de um par de enantiômeros. Estereosseletividade é muitas vezes uma característica de reações enzimáticas, interações mensageiro-receptor e processos metabólicos, que pode variar interespecificamente e até mesmo de um indivíduo para o outro. Portanto, a estereoquímica deve ser considerada quando se estuda xenobióticos, tais como fármacos, agroquímicos, aditivos alimentares, aromas ou fragrâncias.

O interesse na quiralidade e suas consequências não é um fenômeno recente. No entanto, durante a última década tem suscitado crescente expectativas devido a razões ecônomicas e científicas, e a indústria farmacêutica foi a principal incentivadora e contribuinte nesse processo (MAIER et al., 2001). O interesse nesta área contribiu para o planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos, já que o uso de fármacos quirais enantiomericamente puros pode ser

vantajoso por possibilitar a redução na dose administrada, a simplificação na relação dose-resposta, a remoção da fonte de variabilidade inter-objeto e a redução na toxicidade devido ao isômero inativo (CALDWELL, 1996). Porém existe a possiblidade de um enantiômero racemizar em solução ocorrendo o fenômeno da "inversão quiral". A inversão quiral ocorre quando um estereoisômero é metabolicamente convertido em seu enantiômero sem outra alteração na estrutura. Os exemplos mais conhecidos dos agentes submetidos a esse tipo de transformação são: os ácidos 2-arilpropiônico (2-APAs) antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), por exemplo, ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, e os relacionados ácidos herbicidas 2-ariloxipropiônicos, por exemplo, haloxifop. Esta característica conduz a uma aceitação da comercialização de fármacos estereoisoméricos na forma de racemato (LIMA, 1997).

Adicionalmente, as autoridades governamentais que regularizam a produção e distribuição de fármacos, como por exemplo o "Food and Drug Administration" (FDA, EUA) e órgãos equivalentes na Europa, China e Japão enfatizam a necessidade de se ter informações sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais e também fornecem orientações indicando que de preferância apenas o enantiômero ativo do fármaco quiral deve ser trazido para o mercado (LI e HAYNIE,2006).

Enantiômeros possuem propriedades físicas semelhantes tais como: pontos de fusão e ebulição, índice de refração, solubilidade, espectros de infravermelho e demais propriedades físicas (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Portanto não podem ser analisados pelos métodos comuns, necessitando de técnicas analíticas especiais, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo. Alguns métodos empregados são: polarimetria, ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gás-líquido com fase estacionária quiral, birrefringência circular óptica rotatória e dicroísmo circular (LIMA, 1997).

Enantiômeros puros podem ser obtidos por síntese assimétrica ou a partir da resolução da mistura racêmica. A síntese assimétrica é útil para obtenção de pequenas quantidades, porém devido ao tempo utilizado, torna-se inviável para a obtenção das quantidades necessárias nas fases iniciais do processo de descoberta de fármacos. Na pesquisa e desenvolvimento inicial de fármacos quirais, o tempo é uma questão-chave, o que significa que o processo para a geração de enantiômeros puros tem que ser rápido e aplicável a compostos quirais representando uma grande

diversidade na estrutura química. Cromatografia enantiosseletiva em fase estacionária quiral (FEQ) é considerada a rota mais eficiente e geral para a obtenção de enantiômeros de alta pureza óptica, e tornou-se uma ferramenta eficiente na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento inicial de fármacos (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002). As fases estacionárias quirais (FEQs) são, obviamente, um elemento chave na cromatografia enantiosseletiva. Uma FEQ ideal deve apresentar as seguintes características: ser universal (alta capacidade de reconhecimento), deve ser robusta e duradoura (estabilidade química e física), deve tolerar uma grande variedade de fases móveis e deve estar disponível em grandes quantidades e a um preço razoável (FRANCOTTE, 2005).

O secnidazol foi inicialmente sintetizado na França nos laboratórios de pesquisa da Rhône-Poulenc (BENAZET e GUILLAUME, 1976). É um dos derivados nitroimidazólicos mais recentes e possui espectro de atividade contra microorganismos anaeróbicos e eficácia no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (GILLIS e WISEMAN, 1996). O secnidazol é rapidamente e completamente absorvido após administração oral e possui maior meia-vida em relação aos fármacos comumente usadas nesta classe. Portanto o tratamento com secnidazol é mais rápido e significativamente mais eficaz que o tratamento com outros fármacos imidazóis além de apresentar menores efeitos colaterais (RIVERA et al., 2000). Entretanto ele ainda não é oficial em nenhuma farmacopéia (BAKSHI e SINGH, 2004).

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

1.1. Motivação para o trabalho

O secnidazol foi introduzido no Brasil em 1975 e desde então nenhum estudo sobre sua resolução enantiomérica foi realizado. Quando foi sintetizado pela primeira vez na França houve o reconhecimento de suas atividades contra a amebíase e tricomoníase, mas ele não foi desenvolvido porque o metronidazol parecia ter resolvido o problema de tratamento da tricomoníase e revelado-se promissor para o tratamento do fígado e amebíase intestinal (BENAZET E GUILLAUME, 1976). Porém estudos comprovam que o secnidazol é mais eficiente que o metronidazol e pode ser utilizado em doses menores (NÚÑEZ e GÓMEZ, 2005).

Existem vários estudos sobre outros imidazóis que comprovam que um dos enantiômeros é farmacologicamente ativo enquanto o outro pode ser inativo ou tóxico (ABOUL-ENEIN e ALI, 2001).

Seguindo este contexto, vários foram os fatores que motivaram a realização deste trabalho de pesquisa. Dentre os quais podem ser citados:

- A boa separação cromatográfica de alguns imidazóis em coluna contendo fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Segundo ALI (2009) a resolução enantiomérica de vários antifúngicos imidazólicos têm sido reportados em FEQs baseadas em ciclodextranas e polissacarídeos.
- A ausência, na literatura científica, de trabalhos demonstrando o potencial de separação enantiomérica do secnidazol.

1.2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo da separação cromatográfica do fármaco secnidazol em seus enantiômeros puros utilizando como fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, conhecida comercialmente como Chiralpak® AD. Para atingir o objetivo geral traçaram-se as seguintes metas:

- *Screening* de uma fase móvel para separação cromatográfica dos enantiômeros do secnidazol, a partir dos solventes em diferentes composições.
- Verificação da influência da vazão de fase móvel e temperatura no processo de separação.
- Determinação dos parâmetros de separação cromatográfica e de transferência de massa.
- Obtenção dos parâmetros termodinâmicos de separação.
- Determinação das condições de equilíbrio dos enantiômeros na passagem pela coluna, através de suas isotermas de adsorção.
- Separação contínua em leito móvel simulado através do método *shortcut*.

Capítulo 2

2. Revisão Bibliográfica

Este capítulo tem o objetivo de apresentar uma revisão da literatura referente aos fundamentos de estereoquímica, fármacos nitroimidazóis, parâmetros de separação cromatográfica de moléculas quirais e a determinação de parâmetros importante para separação contínua utilizando a tecnologia de leito móvel simulado (LMS).

2.1. Fundamentos de estereoquímica

2.1.1. Introdução

A maioria das moléculas que constituem as plantas e animais são quirais, e geralmente apenas uma forma da molécula quiral ocorre em uma dada espécie. O corpo humano, por exemplo, é estruturalmente quiral, com o coração localizado à esquerda do centro, e o fígado à direita (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). A Figura 2.1 apresenta a representação de um composto quiral. O composto apresenta como centro esterogênico um carbono com quatro ligantes diferentes.

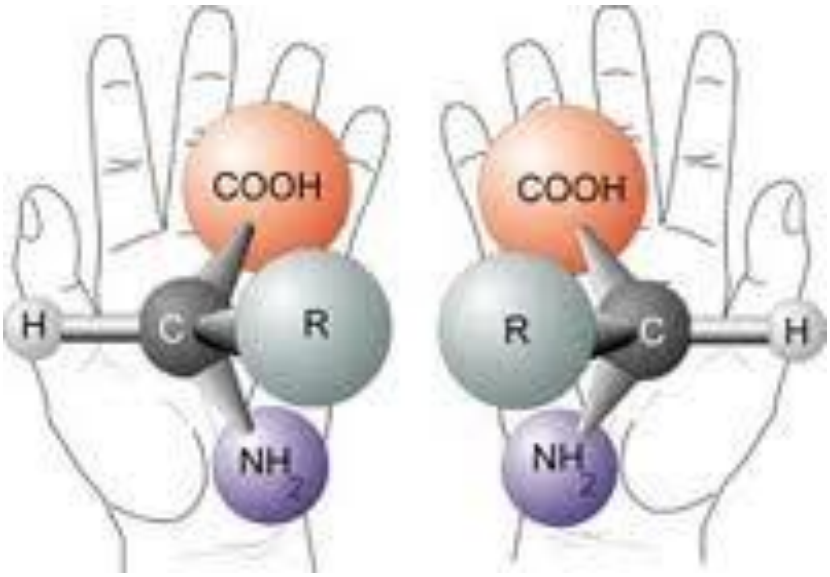


Figura 2.1 – Representação esquemática de moléculas quirais.

A atividade de fármacos contendo estereocentros pode, semelhantemente, variar entre enantiômeros (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Muitas vezes um deles representa o isômero mais ativo para uma determinada ação (eutômero), enquanto o outro (distômero) pode ser ativo em uma forma diferente, contribuindo para os efeitos colaterais, exibindo toxicidade, ou atuando como antagonista (MAIER et al., 2001). Um exemplo clássico da importância da quiralidade na indústria farmacêutica e que não pode ser esquecido é o da talidomida. Na década de 60, a talidomida foi comercializada na sua forma racêmica como um sedativo, para aliviar náuseas matinais em gestantes, porém apresentou sérios efeitos colaterais. Estudos posteriores confirmaram que apenas o R-enantiômero possui a atividade sedativa desejada, enquanto que o S-enantiômero apresenta propriedades teratogênicas, levando a deformações congênitas em fetos, quando administrado em gestantes (SILVA JR et al., 2009).

2.1.2. Estereoquímica

Louis Pasteur foi um dos primeiros a reconhecer a importância dos aspectos espaciais de produtos biológicos, embora remédios de ervas contendo estereoisômeros tinham sido usados como fármacos por séculos (SMITH, 1989). Isômeros podem ser definidos como moléculas que possuem o mesmo número do mesmo tipo de átomos dispostos de maneiras diferentes, podendo

possuir diferentes classificações de acordo com a distribuição atômica (isômeros de função, de cadeia, etc) (LIMA, 1997). Existem duas grandes categorias de isômeros: constitucional (ou estrutural) e isômeros estereoisômeros.

Isômeros constitucionais têm a mesma fórmula molecular, mas os átomos estão dispostos em posições diferentes. Estes são agentes quimicamente distintos. No entanto, eles podem possuir propriedades farmacológicas semelhantes (por exemplo, $C_{21}H_{28}O_5$ que é a fórmula molecular para a cortisona, prednisolona e aldosterona) ou podem ter ações muito diferentes (por exemplo, $C_{10}H_{15}CINO$ que é a fórmula molecular para o cloreto de edrofônio e cloridrato de efedrina).

Estereoisômeros têm conjuntos idênticos de átomos que estão configurados nas mesmas posições, mas estão dispostos espacialmente de forma diferente. Há duas formas principais de estereoisômeros: isômeros geométricos e isômeros ópticos (ou enantiômeros). Isômeros geométricos possuem uma ligação rígida planar sobre quais os grupos de átomos não são capazes de girar livremente. Isômeros ópticos foram assim chamados devido sua capacidade de girar no plano de luz polarizada. Enantiômero é um termo sinônimo (e preferido) que se refere a isômeros ópticos tendo uma relação de imagem de espelho um do outro. Enantiômeros têm as mesmas propriedades químicas, mas falta um plano de simetria e, portanto, não são sobreponíveis: eles giram a luz polarizada igualmente, mas em direções opostas. Isômeros ópticos são mais comuns do que isômeros geométricos (CORDATO et al., 2003).

As moléculas que apresentam mais de um centro quiral apresentam a diastereoisomeria. Diastereoisômeros (ou diastereômeros) referem-se a moléculas que possuem a mesma configuração em um ou mais centros quirais e configurações diferentes em um ou mais centros quirais. Eles ainda são isômeros ópticos, mas devido a diferentes relações entre os seus centros de carbono e grupos químicos ligados eles não estão relacionados como imagens de espelho. Diastereoisômeros têm diferentes propriedades físicas e químicas tais como pontos de fusão e ebulição e solubilidade, e podem ter diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; portanto, eles são considerados fármacos diferentes (CORDATO et al., 2003).

Outro tipo de compostos quirais e também de grande importância farmacêutica são os chamados atropoisômeros. Atropoisômeros são compostos quirais originados pelo impedimento

estérico de uma ou mais ligações simples. Por esse motivo atropoisômeros são também conhecidos por rotâmeros (ORLANDO et al., 2007). A Figura 2.2 apresenta a classificação dos isômeros:

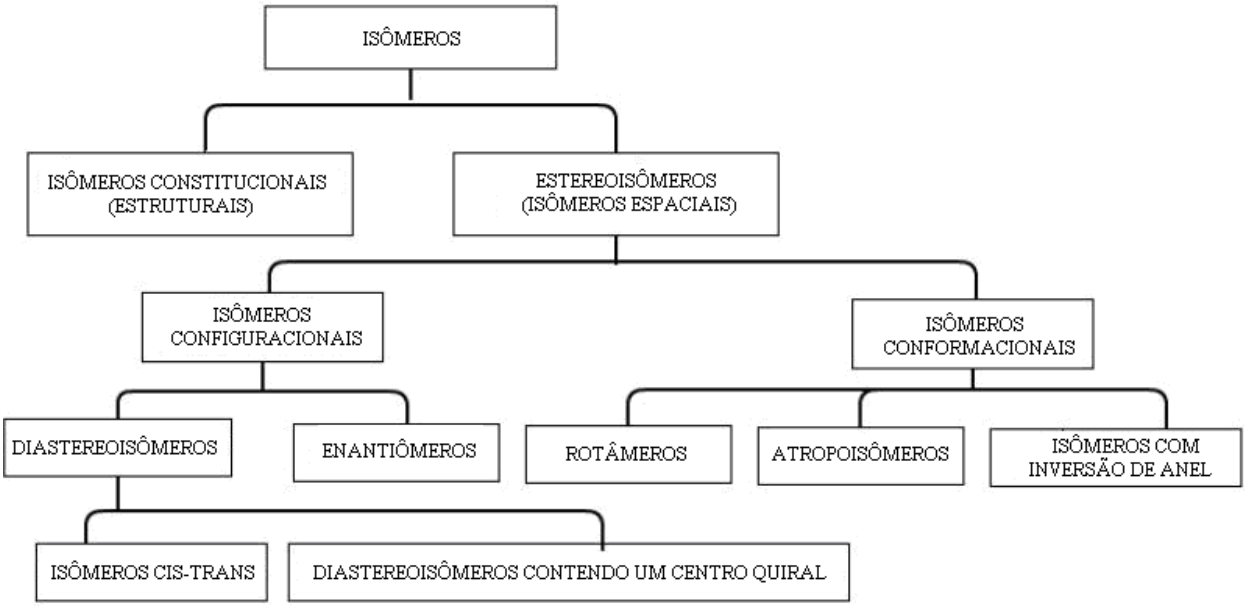


Figura 2.2 – Classificação dos isômeros. (Extraído de SMITH, 2009).

2.1.3. Enantiômeros

Enantiômeros são estereoisômeros que possuem a mesma fórmula molecular e que não se sobrepõem, sendo imagem especular um do outro. Apresentam as mesmas propriedades físicas e químicas, tais como: ponto de fusão e ebulição, solubilidade, densidade, dentre outras. Os enantiômeros giram no plano de luz polarizada em direções opostas e em quantidades iguais (SMITH, 2009). Apresentam comportamento diferente apenas quando interagem com outras substâncias quirais. Eles apresentam taxas diferentes de reação para outras moléculas quirais - isto é, para os reagentes opticamente ativos (SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

2.1.4. Quiralidade

O conceito de quiralidade e sua importância como um fator determinante das propriedades farmacológicas tem sido uma parte do conhecimento científico desde meados de 1800 (REDDY e

MEHVAR, 2004). A partir de partículas elementares para os seres humanos- como o DNA, RNA e aminoácidos, a quiralidade é encontrada em uma ampla gama de objetos. A projeção de uma mão esquerda sobre uma folha de papel é idêntica com a projeção de uma mão direita se você cortá-la e virá-la (Figura 2.3) (WAGNIÈRE, 2007)**.** Existem vários exemplos de quiralidade em nosso meio, por exemplo, as pinturas dos túmulos no Egito, as estruturas helicoidais de plantas e os animais. Resumidamente, quiralidade existe em quase todo este universo e está associada com a origem da terra (ALI et al., 2003).

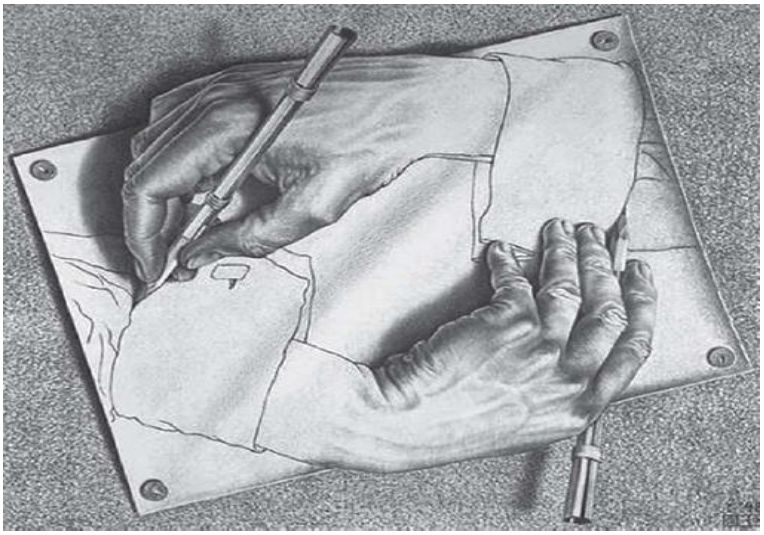


Figura 2.3 – Quiralidade. (Extraído de WAGNIÈRE, 2007)

Quiralidade e noções afins, tais como proquiralidade são conceitos centrais da estereoquímica e tendem a permear todos os campos da química e bioquímica. O nome "quiralidade" em si foi cunhado por Lord Kelvin. Agora, o nome Kelvin está associado a célebre definição: "Eu chamo qualquer figura geométrica, ou grupo de pontos, quiral, e digo que tem quiralidade, se a sua imagem num espelho plano, idealmente realizado, não pode ser trazido para coincidir com ela mesma". Esta definição de Kelvin domina universalmente a concepção de quiralidade em química e bioquímica (GUENNES, 1998).

A quiralidade (lateralidade) de moléculas enantioméricas é causada pela presença de um ou mais elementos de quiralidade (eixo de quiralidade, plano de quiralidade, ou centro de quiralidade) em sua estrutura. O sentido da quiralidade e atividade óptica dos enantiômeros são

determinadas pela sua configuração absoluta, ou seja, o arranjo espacial dos átomos na molécula. Em contraste com a sua conformação, a configuração dos enantiômeros não pode ser alteradas sem uma mudança na conectividade dos átomos constituintes (DAVANKOV, 1997). Na maioria das vezes essas moléculas possuem um centro de assimetria focada em um átomo específico na molécula. Com relação a esses centros de assimetria, os fármacos quirais podem assumir várias formas. Na maioria dos casos, o centro esterogênico é um átomo de carbono tetraédrico ao qual estão ligados quatro substituintes distintos. Alternativamente, entre os fármacos quirais pode possuir átomos de enxofre ou fósforo em seus centros de assimetria (REDDY e MEHVAR, 2004).

Do que foi mencionado até agora, pode parecer que a atividade óptica de uma molécula está ligada à ocorrência de um (ou mais) centro (s) atômico (s) assimetricamente substituído. Mas isso não precisa ser o caso: um belo exemplo para outro tipo de molécula quiral pode ser encontrado nos helicenos, hidrocarbonetos aromáticos orto-condensados policíclicos, que devido ao impedimento estérico, são forçados a adotar uma estrutura não planar. Em uma molécula, como o hexaheliceno, não existem átomos de carbono assimétricos no sentido usual. Em vez disso, a molécula como um todo é obrigada a assumir uma conformação helicoidal de simetria que pode ser no sentido horário ou anti-horário (Figura 2.4). A molécula, portanto, apresenta *quiralidade intrínseca* (WAGNIÈRE, 2007)**.**

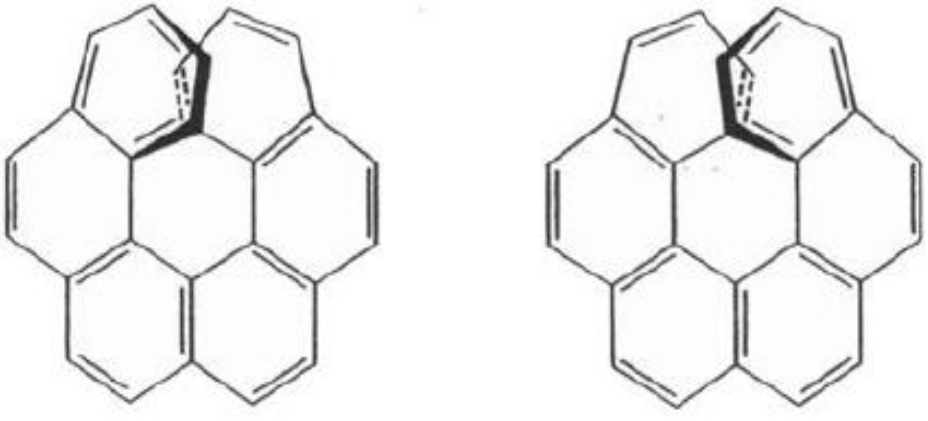


Figura 2.4- Molécula de hexaheliceno. (Extraído de WAGNIÈRE, 2007)

2.2. Fármacos com espectro de atividade contra bactérias e protozoários anaeróbios

2.2.1. Introdução

Infecções parasitárias e bacterianas que afetam o trato gastrointestinal representam uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo. Os fármacos nitroheterocíclicos estão disponíveis desde o início dos anos 1960 para o tratamento de protozoários anaeróbios. A aplicação destes fármacos tem aumentado e são atualmente utilizados para tratar bactérias patogênicas anaeróbias e protozoários. Os 5-nitroimidazóis são um grupo bem estabelecido de agentes antibacterianos e antiprotozoários que inibem o crescimento de ambas bactérias anaeróbias e certos protozoários anaeróbios. As importantes atividades antibacteriana e antiprotozoária dos nitroimidazóis estão associadas com o metabolismo redutivo que levou a um interesse considerável na redução química do nitroimidazol e a síntese de novos fármacos altamente eficazes (MITAL, 2009).

2.2.2. Fármacos nitroimidazóis

A introdução de fármacos nitroheterocíclicos no início dos anos 1960 anunciou uma nova era no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas e gram-positivas e de uma variedade de protozoários patogênicos. O antibiótico azomicina (um 2-nitroimidazol), isolado no Japão a partir de um estreptomiceto em 1955, foi o primeiro nitroimidazol ativo a ser descoberto e atuou como o principal impulso para a busca sistemática de fármacos com atividade contra protozoários anaeróbios. Considerando a sua atividade de largo espectro contra microrganismos anaeróbios, várias investigações em relações à estrutura-atividade desta classe de substâncias foram realizadas, indicando que os 5-nitroimidazóis são mais eficazes do que seus isômeros 4-nitro (TIAN et al., 2003). Isto levou à síntese do 5-nitroimidazol metronidazol (1-β-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol) e da demonstração de sua atividade contra tricomoníase. Posteriormente, o metronidazol mostrou-se eficiente contra a giardíase, amebíase e vaginose bacteriana (UPCROFT et al., 1999). Na década de 1960 o potencial do fármaco como tratamento para a amebíase - doença grave tropical - foi explorado e estabelecido em ambas as formas intestinal e extra-intestinal (NOTOWICZ, 1978).

Compostos nitroheterocíclicos têm uma grande variedade de aplicações, que vão desde conservantes de alimentos a antibióticos. Os nitroimidazóis têm usos terapêuticos como agentes antibacterianos anaeróbios e antiprotozoários. A atividade antimicrobiana destes agentes quimioterápicos inibe o crescimento de bactérias anaeróbicas e alguns protozoários anaeróbios, como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Eles têm outras atividades biológicas interessantes do potencial terapêutico, tais como, radiosensibilizadores no tratamento do câncer, controle da fertilidade, e na terapia antituberculose. Os derivados 5-nitroimidazóis foram testados em células e em ensaios de enzima contra o HIV-1 da transcriptase reversa recombinante. Os 2-nitroimidazóis desempenham um papel importante como marcadores biorredutíveis de tumor, como radiosensibilizadores, e alguns também demonstram atividade antiprotozoária. Alguns derivados dinitro e mono nitroimidazol tem sido previsto como notáveis radiosensibilizadores, agentes antiprotozoários e antibacteriano ou antiepilépticos (MITAL, 2009). Além disso, fármacos nitroimidazóis são amplamente utilizados como aditivos para estimular o crescimento, prevenir e controlar doenças, no entanto, devido a suas propriedades potenciais carcinogênicas e mutagênicas para os seres humanos, suas aplicações para animais produtores de alimentos têm sido proibida em muitos países para assegurar a proteção eficaz dos consumidores (LIAO et al., 2010).

Desde o seu surgimento na década de 1960, o metronidazol tem sido o principal fármaco contra a amebíase intestinal ou extra-intestinal, assim como muitas infecções por protozoários. No entanto, como esperado, depois de um período tão longo, a resistência ao metronidazol amebiana tem sido relatada. O sucesso desses fármacos depende da ativação redutiva do grupo nitro com o fármaco 5-nitro, que é controlada pelo sistema redox da célula-alvo. Como conseqüência, as espécies com caminhos alterados, ausente ou elevado potencial redox são resistentes aos fármacos 5 nitroimidazóis. Felizmente, alguns medicamentos têm sido citados como eficazes contra amebas resistente ao metronidazol: tinidazol, nitazoxanida, cloroquina, paromomicina e outros (LEIROS et al., 2004; PALHARES, 2008).

Os nitroimidazóis são imidazóis heterocíclicos com um grupo nitrogênio incorpado em sua estrutura. A triagem de bioensaios de derivados dos 5-nitroimidazóis resultou na descoberta

do dimetridazol, metronidazol, ornidazol, secnidazol, ronidazol, e ipronidazol. As estruturas destes fármacos são dadas na Figura 2.5 (PINTO et. al, 2010; TIAN et al., 2003).

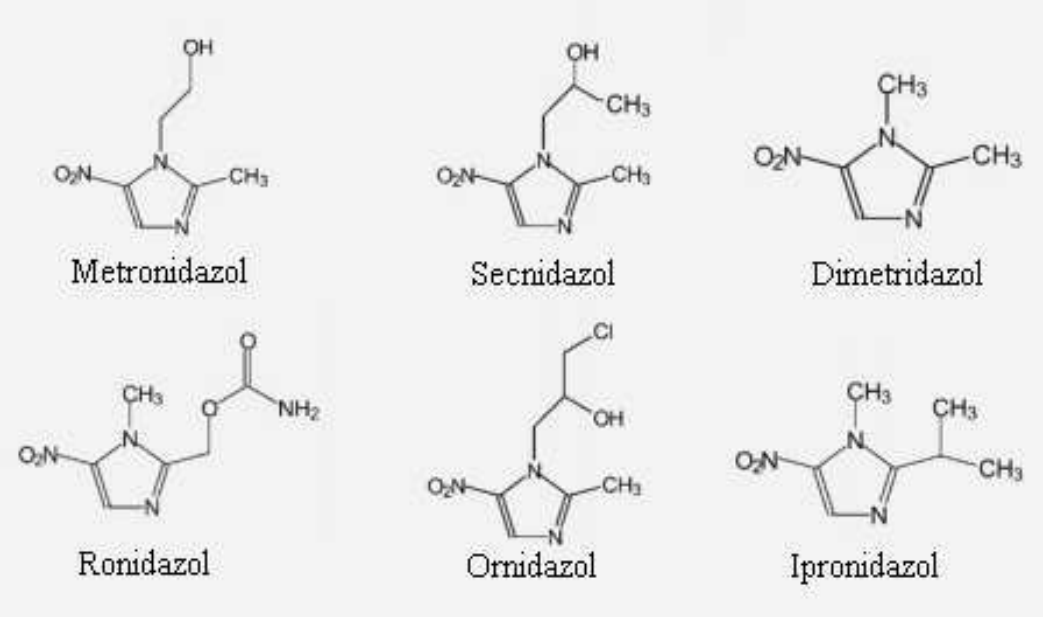


Figura 2.5- Estruturas químicas dos nitroimidazóis.

Os nitroimidazóis são fármacos muito semelhantes em sua estrutura e, portanto, têm várias propriedades biológicas em comum. Assim, o grupo 5-nitro é essencial para a sua ação terapêutica, e seu grau de atividade contra bactérias anaeróbias e protozoários parasitas de seres humanos e animais é muito semelhante. Certas propriedades toxicológicas também são comuns aos nitroimidazóis, notavelmente a sua capacidade de induzir mutações em vários sistemas de teste bacteriano e aumentar a produção de tumores em animais de laboratório. Ambas atividades antimicrobiana e mutagênica envolvem a redução do grupo 5-nitro com a formação de um derivado de hidroxilamina de curta duração que podem se ligar covalentemente a macromoléculas de tecidos diversos (RAETHER e HÄNEL, 2003).

2.2.3. Secnidazol

O secnidazol corresponde à formulação 1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (Figura 2.6) com fórmula molecular $C_7H_{11}N_3O_3$ e massa molar de 185,18 g/gmol. Foi sintetizado pela primeira vez nos laboratórios de pesquisa da Rhone-Poulenc na França. Na época foram

reconhecidas suas atividades contra tricomoníase e amebíase, mas o produto não foi desenvolvido porque o metronidazol (que havia sido sintetizado nos mesmos laboratórios) parecia ter resolvido o problema terapêutico da tricomonose e revelou-se muito promissor para o tratamento do fígado e amebíase intestinal (BENAZET e GUILLAUME, 1976).

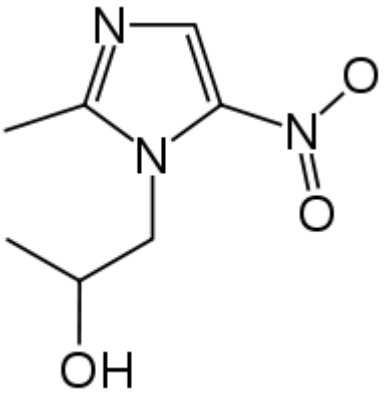


Figura 2.6- Estrutura química do secnidazol.

O secnidazol é um dos derivados nitroimidazólicos mais recentes, e como já citado, possui espectro de atividade contra microorganismos anaeróbicos e eficácia no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (GILLIS e WISEMAN, 1996). Por ser completamente absorvido após administração oral e possuir maior meia-vida de eliminação terminal (17 h à 29 h) além de demonstrar uma potência antiamebiana dez vezes maior que o metronidazol e o ornidazol pode ser uma valiosa alternativa em substituição destes fármacos devido aos menores efeitos colaterais. Se o enantiômero ativo do racemato puder ser usado, a dosagem pode ser reduzida a metade. Assim, a necessidade de obter enantiômeros opticamente puros do secnidazol é bastante óbvia (BACKER et al., 2010; TIAN et al., 2003).

As evidências disponíveis sugerem que o secnidazol é tão eficaz quanto os outros fármacos 5-nitroimidazóis no tratamento de infecções causadas por protozoários e vaginose bacteriana. A conveniência e facilidade de administração associados com a terapia de dose única, combinada com um bom perfil de tolerabilidade, fazem do secnidazol uma opção adequada a outros tratamentos de dose única e uma alternativa atraente para os regimentos de doses múltiplas com outros fármacos desta classe (GILLIS e WISEMAN, 1996). Porém o secnidazol ainda não é

oficial em nenhuma farmacopéia e não há informações na literatura sobre o comportamento de estabilidade deste fármaco sob condições hidrolítica, oxidativa e térmica (BAKSHI e SINGH, 2004).

2.2.3.1. Determinação da configuração absoluta do secnidazol

O ornidazol e o secnidazol são ambos álcoois secundários, o primeiro é uma cloridrina com o átomo de cloro na posição terminal. Cloridrinas podem ser separadas a partir de seus antípodas ópticos por resolução de lipase-catalisada e de acordo com a literatura foi demonstrado que a lipase à partir de *Pseudomonas sp*. é a melhor escolha entre as enzimas comerciais disponíveis. Se os substituintes dos dois lados de um álcool secundário diferirem em tamanho e um lado possuir um sistema carbocíclico ou aromático como o maior grupo, a enantiosseletividade poderá ser satisfatória. A configuração absoluta do secnidazol pode ser deduzida pela regra de Kazlauskas, na qual se prevê que o enantiômero mostrado na Figura 4.9 prossegue mais rapidamente do que o seu antípoda na esterificação lipase-catalisada de álcoois secundários. **M** e **L** representam substituintes médio e grande, respectivamente. Se a regra de Kazlauskas for aplicável ao secnidazol, a configuração absoluta do secnidazol acilante [(-)-sec], deverá ser R.

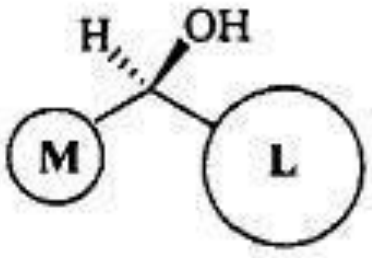


Figura 2.7 – Regra de Kazlauskas para a enantiopreferência da lipase da *Pseudomonas sp.*

A fim de verificar a inferência sobre configuração absoluta do R-(-)-sec, foi preparado um derivado correspondente **R-(-)-5** [R-(-)-4-bromo-benzóico-1-metil-2-(2-metil- 5-nitroimidazol-1-γl)- éster etílico] (Figura 2.8).

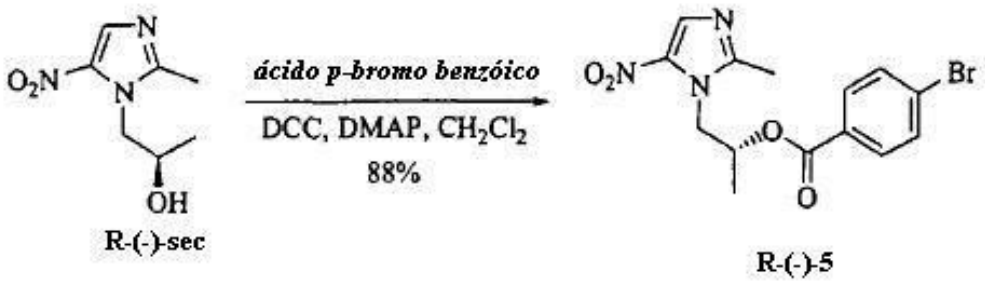


Figura 2.8 – Preparação do derivado R-(-)-5 correspondente ao R-(-)-sec.

Quando este derivado foi recristalizado a partir de acetato de etila / éter de petróleo, um único cristal do enantiômero puro pode ser obtido. A estrutura cristalina do composto R-(-)-5 é mostrada na Figura 2.9.

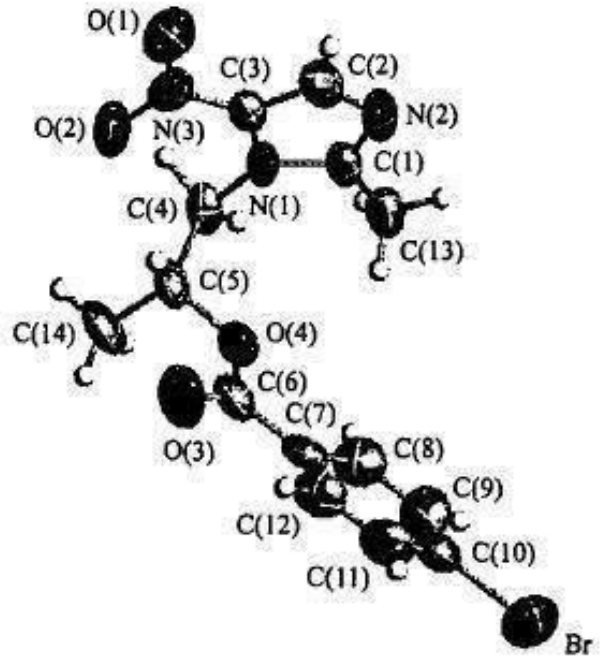


Figura 2.9 – Estrutura cristalina do composto R-(-)-5.

Uma vez que o espalhamento de raios-X (cobre) anômalo de bromo processa a determinação direta da estrutura absoluta, a configuração absoluta do composto (-)-5 foi

estabelecida como R, o que significava que a configuração absoluta de (-)-sec é R. Assim, a suposta configuração absoluta pela regra de Kazlauskas foi confirmada por cristalografia de raios-X. Este resultado indica que a regra é útil para álcoois secundários que possuem um substituinte aromático heterocíclico apesar da sua estrutura eletrônica não-uniforme (TIAN et al.,2003).

2.3. Fármacos quirais

A quiralidade dos fármacos é hoje um tema importante na concepção, descoberta, desenvolvimento, lançamento e comercialização de novos fármacos. A estereoquímica é uma dimensão essencial na farmacologia, uma vez que cerca de 56% dos fármacos atualmente em uso são compostos quirais, e 88% desses fármacos quirais sintéticos são usados terapeuticamente como racematos. Nas últimas décadas a farmacopéia foi dominada por racematos, mas desde o surgimento de novas tecnologias na década de 1980 que permitiu a preparação dos enantiômeros puros em quantidades significativas, a consciência e o interesse na estereoquímica de ação dos fármacos aumentou (CARNER et al., 2004). Atualmente, é essencial a geração do par de enantiômeros puros, uma vez que muitas vezes eles apresentam diferenças marcantes na atividade biológica. Assim, os enantiômeros individuais têm de ser submetidos a avaliação completa das propriedades farmacocinéticas, metabólicas, fisiológicas e toxicológicas, a fim de identificar o enantiômero mais adequado para o desenvolvimento de um fármaco terapêutico. Além disso, esses dados também são exigidos por diferentes agências reguladoras (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002; RENTSCH, 2002).

Os enantiômeros de um fármaco quiral podem apresentar diferentes comportamentos biológicos e farmacológicos em sistemas vivos quirais. Isso pode ser facilmente entendido com o exemplo de um modelo de fármaco-receptor representado na Figura 2.10. Na posse de diferentes configurações espaciais, um isômero ativo pode ligar justamente para os sítios de destino (α, β, γ), enquanto um isômero inativo pode ter uma ligação desfavorável ou se ligam a outros alvos não-intencionais.

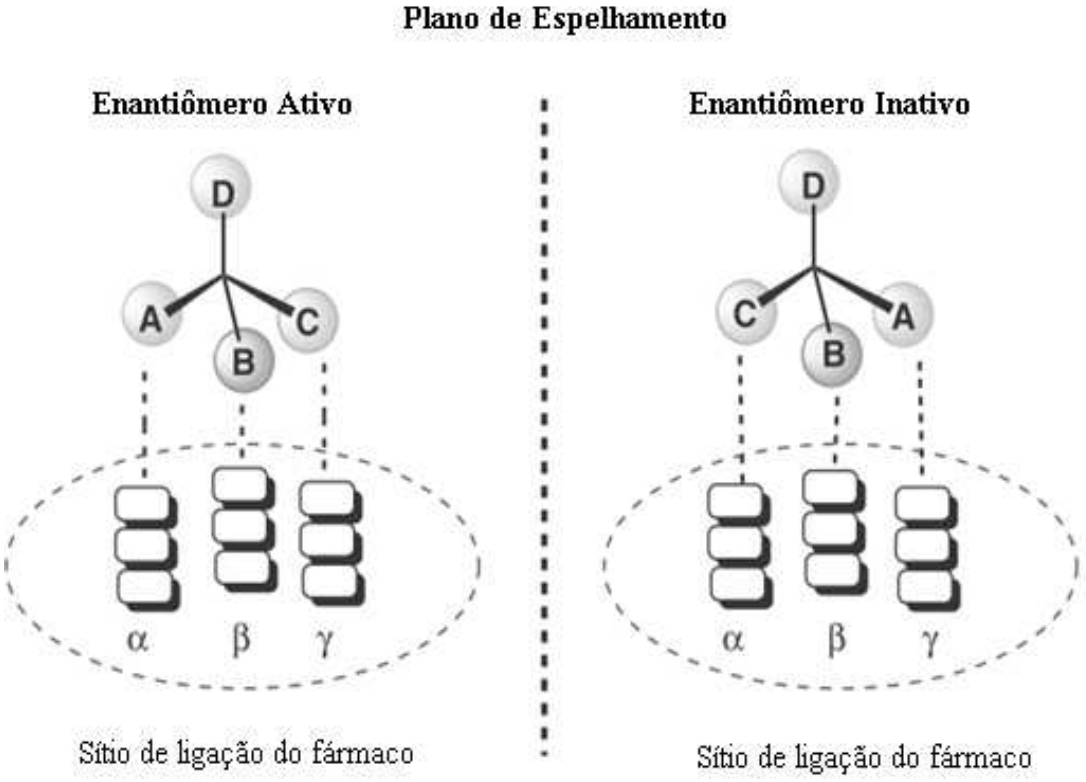


Figura 2.10 - Ligação estereosseletiva de enantiômeros de um fármaco quiral. (Extraído de LIN et al., 2011)

Efeitos farmacológicos de fármacos quirais podem ser classificados da seguinte forma:

1. *Ambos enantiômeros agem no mesmo alvo biológico, mas um isômero tem afinidade maior de ligação do que a outro.* Por exemplo, o carvedilol é comercializado como um racemato para o tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva.

2. *Ambos enantiômeros agem no mesmo alvo biológico, mas exercem atividades farmacológicas opostas.* Por exemplo, a (-)-dobutamina demonstrou uma atividade agonística contra α-adrenérgicos, enquanto que seu antípoda (+)-dobutamina é um antagonista contra os mesmos receptores.

3. Ambos os enantiômeros podem agir da mesma forma, mas eles não têm um efeito sinérgico. Por exemplo o △-3-tetrahidrocanabinol onde o S-enantiômero possui ação qualitativamente similar ao R-enantiômero porém ele é quantitativamente menos potente. Ao administrar os dois enantiômeros em conjunto não há aumento no efeito do fármaco, confirmando que a atividade estava exclusivamente em um enantiômero e que não houve efeito sinérgico entre os dois isômeros.

4. *Ambos os enantiômeros têm efeitos terapêuticos independentes através da ação sobre alvos diferentes.* O exemplo clássico desse comportamento é a quinina e a quinidina. Enquanto a quinina tem sido utilizada para o tratamento de malária, a quinidina, por outro lado, é usado como um agente antiarrítmico e age aumentando a duração do potencial de ação.

5. *Um ou ambos os enantiômeros têm o efeito desejado; ao mesmo tempo que apenas um enantiômero pode causar efeitos colaterais indesejados.* A dropropizina racêmica tem sido muito utilizada na terapia humana como um agente antitussígeno. Estudos recentes têm revelado que a (S)-dropropizina possui a mesma atividade antitussígena como a mistura racêmica, mas tem menor atividade seletiva.

6. *O enantiômero inativo pode antagonizar os efeitos colaterais do antípoda ativo*. Em tais casos, tendo em conta tanto a eficácia e os aspectos de segurança, o racemato parece ser superior a qualquer enantiômero sozinho. Por exemplo, o tramadol é um analgésico opióide usado como um racemato e não está associado com os efeitos colaterais clássicos dos fármacos opiáceas, como depressão respiratória, constipação, ou sedação (LIN et al., 2011).

Para trabalhar adequadamente com fármacos quirais no desenvolvimento e na monitorização de fármacos terapêuticos, ou em toxicologia clínica e forense, as formas opticamente ativas pura dos compostos racêmicos devem ser identificadas. As diferentes propriedades biológicas dos enantiômeros de alguns fármacos são apresentados na Tabela 2.1 (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

Tabela 2.1- Diferentes propriedades fisiológicas dos enantiômeros de alguns fármacos.

Fármacos	(+)- Enantiômero	(-)-Enantiômero
Barbitúricos	Sedação	Excitação
Dobutamina	β_1 e β_2-adrenérgicos agonista (vasodilatação)	α_1-adrenérgico agonista (inotrópico positivo/ vasoconstrição)
Fluoxetina	Inibidor seletivo da serotonina	Efeito mínimo
Cetamina	Anestésico forte	Anestésico fraco
Fenfluramina	Inibidor seletivo da serotonina	Dopamina(efeito colateral)
Levodopa	Antiparkinsônica	Agranulocitose
Metadona	Efeito mínimo	Analgésico forte
Metanfetamina	Estimulante do sistema nervoso	Vasodilatador periférico
Penicilamina	Antirreumático	Neurotóxicos
Pentazocina	Ansiedade	Analgesia, depressão respiratória
Propoxifeno	Analgesia	Antitussígeno
β-adrenérgicos antagonista (por exemplo, propranolol)	Supressor de arritmia ventricular sem bloqueio do β-adrenérgico	Bloqueador β-adrenérgico ativo
Morfina	Efeito minimo	Analgésico forte
Tiroxina	Inativo	Efeito tiroxímico
Verapamil	Efeito mínimo	Dromotrópico e inotrópico negativo; efeitos cronotrópicos
Varfarina	Anticoagulante fraco	Anticoagulante
Talidomida	Sedativo	Sedativs, teratogênico
Picenadol	agonista do μ-receptor (analgésico)	Antagonista fraco do μ-receptor
Tetramisole	Efeito mínimo	Anti-helmíntico
Agentes antiinflamatório não esteróidal	Anti-inflamatório	Efeito mínimo

O uso de uma mistura racêmica para novos fármacos só é permitido se todos os ensaios clínicos e toxicológicos forem realizados com cada enantiômero isoladamente e comparados com aqueles envolvendo a mistura racêmica (BARREIRO et al., 1997).

2.3.1. Tendências no desenvolvimento de fármacos quirais

Uma análise geral de fármacos aprovados no período de 20 anos, de 1983 à 2002, (Figura 2.11) indica que os fármacos compostos de enantiômeros individuais ultrapassou os fármacos aquirais enquanto os racematos representaram a categoria minoritária de 23% dos fármacos aprovados em todo o mundo. A preponderância de enantiômeros individuais foi provavelmente impulsionada pela onda de enantiômeros individuais aprovados que ocorreram desde 1998. Em 2001 não houve racematos aprovados enquanto dois fármacos racêmicos foram aprovados em

2002 (no Japão e na Coréia do Sul). Enantiômeros individuais atingiram 50% de todos os fármacos aprovados pela primeira vez em 1998, aumentando para mais 60% entre 2000-2001. Essas tendências foram provavelmente influenciadas consideravelmente pela diretrizes das agências reguladoras nas importantes jurisdições, o que favoreceu e incentivou o desenvolvimento de fármacos com enantiômeros individuais sobre racematos, contabilizando assim para a mudança dramática de interesse da empresa farmacêutica na fabricação de fármacos seguros de enantiômeros individuais e fármacos aquirais sobre os fármacos racêmicos problemáticos (CARNER et al., 2004).

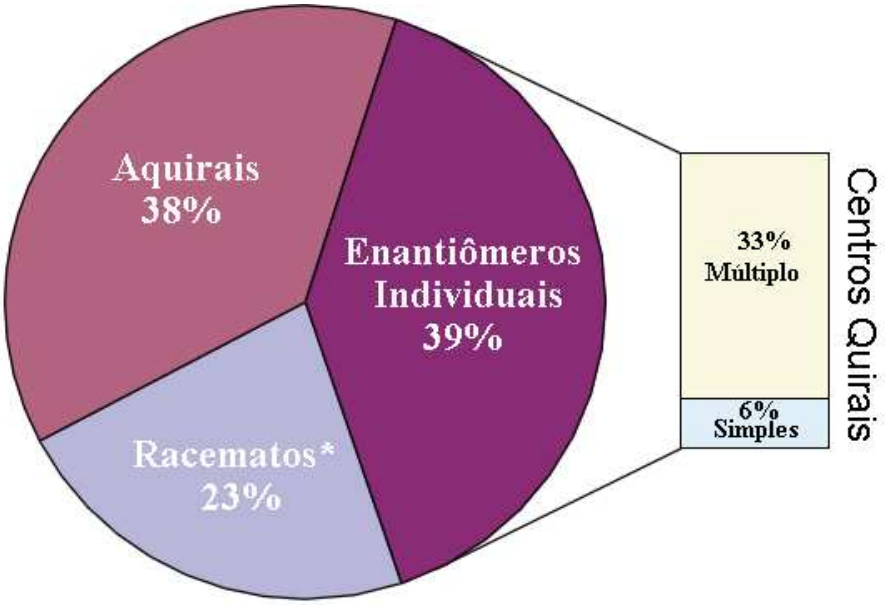


Figura 2.11 - Distribuição de fármacos aprovados em todo o mundo de acordo com o caráter de quiralidade no período 1983-2002. * Incluindo misturas diastereoméricas. (Extraído de CARNER et al., 2004)

Uma análise das novas entidades moleculares (NEMs) aprovadas pelo FDA dos EUA em 2008 deu a seguinte distribuição aproximada: 63% enantiômeros individuais, 32% fármacos aquirais, e apenas 5% racematos. No geral, há clara tendência de que os fármacos racêmicos estão diminuindo desde 1992 (cerca de 21%) para 2008 (5%), sem introdução de fármacos racêmicos em 2001 e 2003. Os fármacos quirais aumentaram de 30-40% na década de 1990 para

cerca de 60% ou mais desde 2000. Uma quantidade significativa de fármacos ainda são aquirais (Figura 2.12) (LIN et al., 2011).

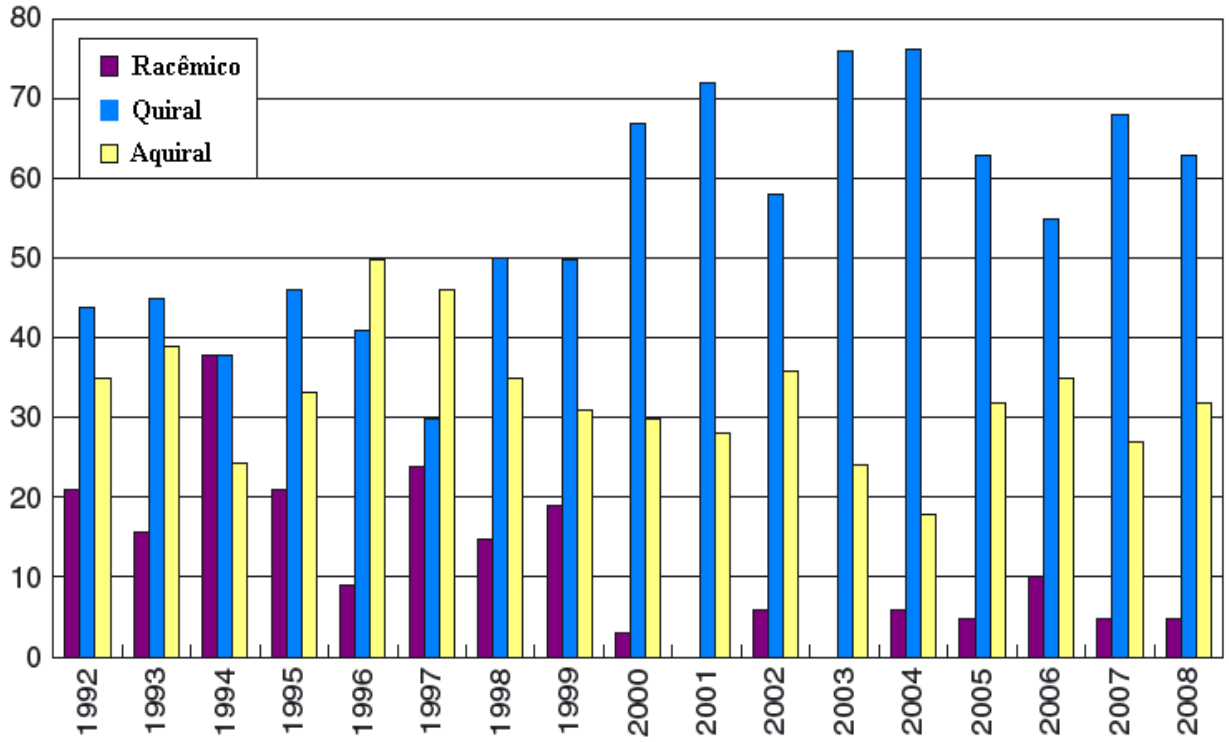


Figura 2.12 - Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA.

A indústria quiral pode ser dividida em duas categorias principais: a fabricação de compostos quirais e a análise de compostos quirais. A fabricação quiral continuará a dominar o mercado: ela passou de um faturamento de mais de $1 bilhão em 2003 para mais de $1,6 bilhões em 2008. Enantiômeros terapêuticos puros tiveram vendas de $ 225 bilhões em 2005, representando 37% do mercado total final de formulação farmacêutica. A taxa composta de crescimento anual para produtos de enantiômero puro ao longo dos últimos cinco anos é de 11%, o que está a par com o mercado farmacêutico como um todo. Os fármacos quirais representam mais da metade dos fármacos aprovados em todo o mundo, incluindo muitos dos fármacos mais vendidos no mundo. Por exemplo, entre as 10 prescrições de produtos farmacêuticos mais vendidos nos EUA em 2009, seis deles são enantiômeros puros, dois são aquiral, e apenas dois racematos (Tabela 2.2) (LIN et al., 2011).

Tabela 2.2- *Top* 10 dos terapêuticos mais vendidos nos EUA em 2009.

Ranking	Produto	Ingrediente Ativo	Forma de Ingrediente
1	Lipitor	Atorvastatina	Enantiômero puro
2	Nexium	Esomeprazol	Enantiômero puro
3	Plavix	Clopidogrel	Enantiômero puro
4	Advair Diskus	Fluticasona salmeterol	Enantiômero puro, racemato
5	Seroquel	Quetiapina	Aquiral
6	Abilify	Aripiperazol	Aquiral
7	Singular	Montelukast	Enantiômero puro
8	OxyContin	Oxicodona	Enantiômero puro
9	Actos	Pioglitazona	Racemato
10	Prevacid	Lansoprazol	Racemato

A separação de enantiômeros de fármacos é ainda algo problemático pois a cromatografia tradicional não fornece seletividade alta o suficiente para diferenciar enantiômeros de um mesmo composto. O desenvolvimento de métodos robustos para a separação de enantiômeros de compostos quirais é um desafio. Por outro lado, o desenvolvimento extensivo de análise enantiosseletiva tem ocorrido ao longo das últimas duas décadas em resposta à demanda no campo de desenvolvimento de fármacos para as tecnologias eficientes utilizadas na preparação de compostos enantiomericamente puros e controle de qualidade desses processos. Entre as técnicas de separação mais populares usadas para análises enantioméricas estão a cromatografia líquida, seguida por eletroforese capilar e cromatografia gasosa (KASPRZYK-HORDERN, 2010).

A separação de um composto racêmico em seus enantiômeros é chamada de resolução. Várias metodologias têm sido usadas para a resolução dos enantiômeros em ambas escalas analítica e preparativa. As diferentes técnicas podem ser categorizadas em duas classes: a abordagem clássica, usando degradação enzimática de um dos enantiômeros e cristalização preferencial; e as tecnologias modernas que incluem espectroscopicas, métodos eletroforéticos e cromatográficos. Atualmente, os métodos cromatográficos, eletroforéticos, espectroscópicos, biossensores, e de membrana são os mais comumente aplicados (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco, seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas é, obviamente, um pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e controlar a qualidade. As principais técnicas analíticas capazes de fornecer essas informações são baseadas na ciência da separação (BONATO et al.,2005).

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (COLLINS et al., 2006). A cromatografia 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 móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al., 1998). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares (COLLINS et al., 2006).

Um sistema moderno de cromatografia líquida de alta eficiência pode ser composto dos seguintes itens:

- Sistema de bomba de alta pressão - a bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado;
- Injetor - as válvulas de injeção usadas possuem uma alça (*loop*) de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. Existem alças de diversos volumes, sendo utilizadas geralmente alças na faixa de 5-50 μL para injeções analíticas e 0,5-2 mL para preparativas;
- Coluna - as colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno

de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação;

- Detector - O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de indíce de refração e eletroquímicos. Detectores de polarimetria para CLAE, recentemente desenvolvidos, diferenciam compostos quirais, através da rotação de seus estereoisômeros frente à luz plano-polarizada;
- Computador para aquisição de dados e controle dos módulos (DEGANI et al., 1998).

A Figura 2.13 apresenta um esquema de um sistema de CLAE.

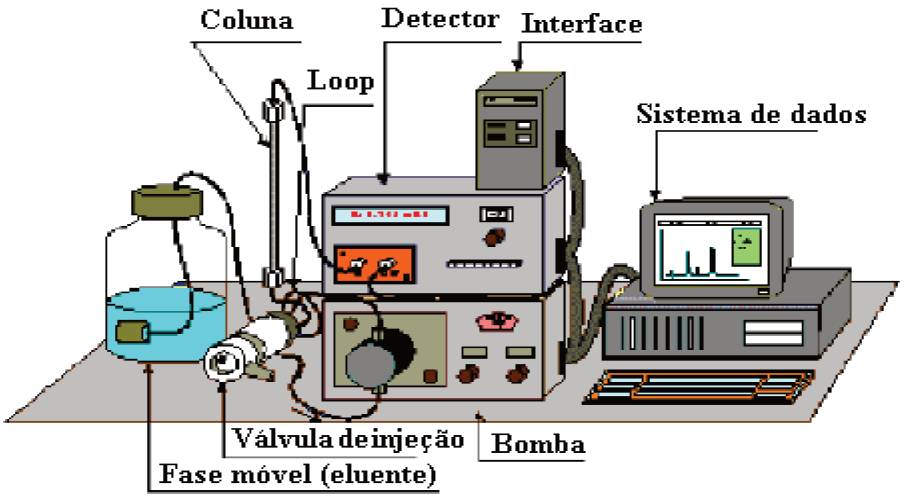


Figura 2.13- Esquema de um sistema de CLAE.

Eluição é a maneira mais usual como ocorre o desenvolvimento da separação da amostra em CLAE. Ela pode ser de dois tipos: isocrárica e por gradiente. Eluição isocrática é aquela na qual a força cromatográfica da fase móvel permanece constante durante toda a separação. Eluição por gradiente é aquela na qual a composição da fase móvel varia durante a separação, de modo que a força cromatográfica aumenta gradativamente.. Com isso, obtém-se maior simetria para os picos cromatográficos, melhor resolução e detectabilidade e menor tempo de análise. A eluição isocrática é o modo preferido de eluição devido a sua simplicidade, conveniência, repetitividade das análises e menor custo, uma vez que não necessita de equipamentos especiais (COLLINS et al., 2006).

2.4.1. Cromatografia quiral

Os enantiômeros puros têm sido foco de vários estudos, podendo ser obtidos por síntese assimétrica ou por resolução de misturas racêmicas por cromatografia quiral. A cromatografia preparativa em fase estacionária quiral é considerada hoje ser a rota mais eficiente e geral para a obtenção de enantiômeros ópticos de alta pureza, e tornou-se uma ferramenta eficiente na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de novos fármacos. Um dos critérios mais importantes para a separação de enantiômeros é a seletividade quiral expressa por uma FEQ particular, que é determinada pela diferença na estabilidade dos complexos diastereoisoméricos formados entre os enantiômeros individuais e o seletor quiral. A resolução pode ser otimizada, alterando a composição da fase móvel, vazão ou temperatura. No entanto, para uma dada separação preparativa, a fase móvel que resulta na maior seletividade nem sempre é ideal, já que outros parâmetros como capacidade de carga, a solubilidade do racemato na fase móvel, a estabilidade química da FEQ e também o tempo de retenção dos enantiômeros podem, por vezes superar a seletividade (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002).

Os mecanismos de reconhecimento quiral em todos os seletores quirais são bastante semelhantes, exceto nos trocadores de ligante. Todos os seletores quirais proporcionam uma superfície quiral aos enantiômeros, que formam com os seletores complexos temporários, possuindo energias de ligação diferentes. Os enantiômeros diferem em suas energias de ligação, porque eles se encaixam de maneira diferente nas estruturas dos seletores quirais. Novamente, as diferentes estereoconfigurações dos enantiômeros são responsáveis pelas diferenças no ajuste dos seletores quirais. Estes complexos temporários são estabilizadas por uma série de interações. Os principais tipos de interações, responsáveis pela discriminação entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, no sentido decrescente de intensidade, são: interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica, interação π- π e íon-dipolo, interação dipolo-dipolo, interação dipolo-dipolo induzido e dispersão de London. As interações coulômbicas e do tipo π-π podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas. O modelo de “interação de três pontos” é bem aceito no meio científico, principalmente para explicar a discriminação de aminoácidos em fases estacionárias quirais do tipo troca de ligantes. Entretanto, esse mesmo modelo é frequentemente questionado para explicar as separações em

seletores quirais de proteínas. Em geral, o mecanismo de reconhecimento quiral em um seletor quiral é baseado em um arranjo de chave e fechadura (Figura 2.13) (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003; LOURENÇO et al.,2010).

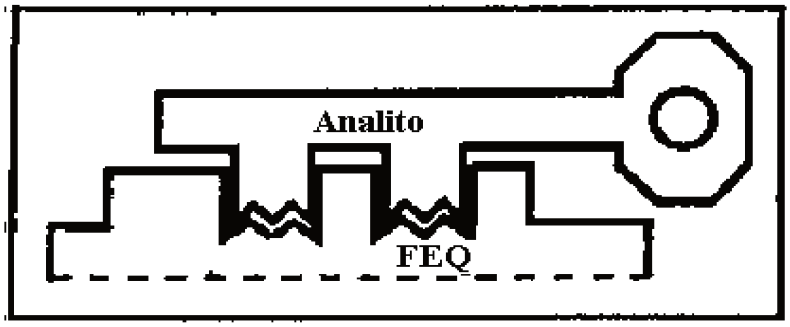


Figura 2.14- Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento quiral.

2.4.2. Fase Móvel

A fase móvel (FM) desempenha um importante papel na CLAE, pois sua composição quase sempre é fundamental no processo de separação. Portanto, a FM exerce duas funções, arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação. As principais características que as fases móveis devem apresentar são:

- ser de alto grau de pureza e de fácil purificação.
- solubilizar a amostra sem decompor ou dissolver a fase estacionária.
- não decompor ou dissolver a fase estacionária.;
- ter baixa viscosidade e ponto de ebulição.
- ser compatível com o tipo de detector utilizado.
- ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (COLLINS et al., 2006).

A escolha da fase móvel é um ponto crítico para separações de enantiômeros. De fato, a seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do racemato muitas vezes são muito sensíveis às mudanças da composição da fase móvel (FRANCOTTE, 2001).

2.4.3. Fases Estacionárias Quirais

Durante as últimas duas décadas, o número de fases estacionárias quirais disponíveis para a separação de enantiômeros cresceu rapidamente e tornou possível desenvolver uma separação analítica de qualquer mistura racêmica, assim, a seletividade não é geralmente um problema. No entanto, o número de FEQs que são de uso prático no desenvolvimento de uma separação preparativa eficiente de enantiômeros são bastante restritas devido às questões da capacidade de carga química e/ou estabilidade mecânica, disponibilidade em grandes quantidades a um custo razoável, bem como limitações do solvente que pode ter um grande impacto tanto na solubilidade quanto na retenção do composto quiral e, portanto, sobre a produtividade (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002). Se, por um lado, o crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e comercialmente disponíveis possibilita a separação dos enantiômeros de uma ampla variedade de compostos, ao mesmo tempo dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação. Em vista disto, as fases estacionárias são classificadas em cinco diferentes grupos, de acordo com as interações analito/FEQ. Posteriormente, as FEQs foram reclassificadas de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético, da fase estacionária (Tabela 2.3) (LOURENÇO et al., 2010).

Tabela 2.3- Seletores quirais e principais interações com analitos quirais.

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 π- π e ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação π- π, ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo
	Polímeros impressos molecularmente (MIPs)	Específico para cada analito

A escolha da fase estacionária e das condições cromatográficas é determinada por fatores como a seletividade e capacidade de carga de uma FEQ, a concentração desejada e a velocidade de operação, a solubilidade do racemato, bem como as propriedades físicas da FEQ (ANDERSSON e ALLENMARK, 2002). Alguns parâmetros são importantes para a escolha da FEQ, os principais são (SILVA JR et al., 2006):

- estabilidade química, a qual limita o número de fases móveis disponíveis e, indiretamente a solubilidade máxima do soluto;
- estabilidade mecânica, a qual é particularmente importante em aplicações de CLAE, onde pequenas partículas são utilizadas e elevadas quedas de pressão são impostas;
- tempo de vida médio;
- capacidade de carga;
- custo.

2.4.3.1. Fases Estacionárias Quirais Baseadas em Polissacarídeos

Os polissacarídeos, como celulose e amilose, estão entre os mais importantes e abundantes biopolímeros naturais na Terra e são opticamente ativos. Celulose e amilose em si não podem ser usadas como FEQs comerciais devido sua pobre capacidade de resolução. Portanto, esses polímeros foram derivatizados como tricarbamatos ou triésteres em uma matriz de sílica gel pré-tratada. As moléculas de celulose contém ligações β-glicosídicas do tipo β-1,4 e formam uma estrutura linear, enquanto que as moléculas de amilose apresentam ligações α-glicosídicas do tipo α-1,4 e adotam uma estrutura helicoidal (Figuras 2.15 e 2.16). Mais de 90% das resoluções enantioméricas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são realizadas utilizando fases estacionárias quirais (FEQs) baseadas em polissacarídeos. Entre elas, fenilcarbamatos de celulose e amilose parecem ser algumas das FEQs mais úteis (ABOUL-ENEIN e ALI, 2002; SILVA JR et al., 2006; SHEN et al., 2010).

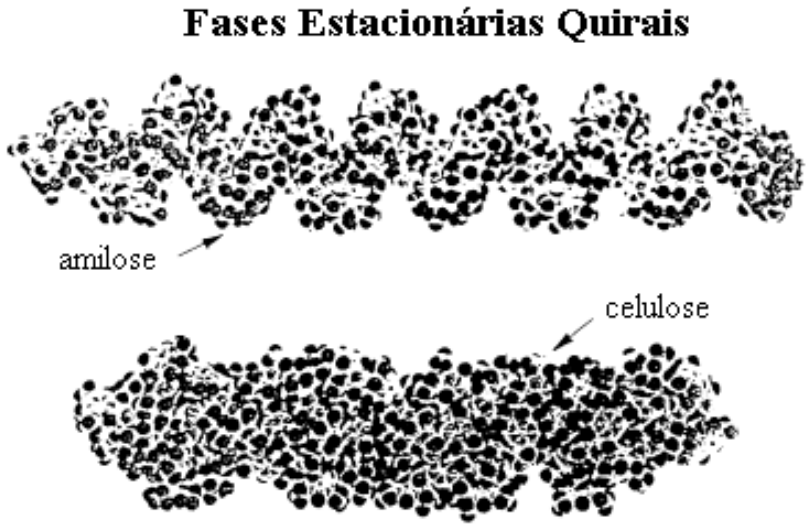


Figura 2.15- Estruturas tridimensionais de amilose e celulose. (Extraído de ABOUL-ENEIN e ALI, 2002)

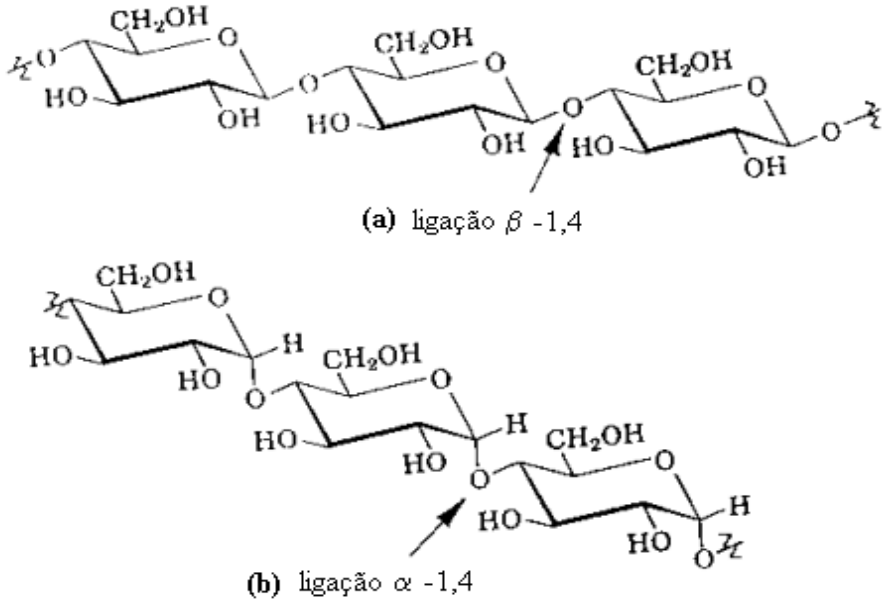


Figura 2.16- Estruturas estruturas químicas dos polímeros de (a) celulose e (b) amilose. (Extraído de ABOUL-ENEIN e ALI, 2002)

Os polissacarídeos têm a capacidade de separações quirais devido suas estruturas assimétricas (*grooves*). Os mecanismos de reconhecimento quiral em um nível molecular sobre as FEQs baseadas em polissacarídeos ainda não estão claros devido as dificuldades nos estudos espectroscópicos desses seletores. Vários experimentos vêm sendo feitos para resolver este enigma (ALI et al., 2006). As FEQs de celulose e amilose foram comercializados pela Daicel® Chemical Industries de Tóquio.

As fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição: fase normal, fase reversa e polar orgânico. O modo fase normal é caracterizado pelo uso de fases móveis compostas de hexano-álcool, normalmente isopropanol ou etanol; podendo adicionar pequenas quantidades (até 0,5%, v/v) de uma base orgânica (dietilamina) ou um ácido orgânico (ácido trifluoracético). O emprego desses aditivos tem por finalidade principal reduzir a interação de analitos básicos e ácidos, respectivamente,com os grupos silanóis residuais presentes na sílica empregada como suporte para essas fases estacionárias. No modo fase reversa, as colunas são empregadas com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, normalmente acetonitrila ou metanol. O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, propanol, ou ainda misturas desses solventes. O uso desse tipo de fase móvel representa uma alternativa adicional para se obter a separação desejada, inclusive com possibilidade de inversão na ordem de retenção, maior solubilidade de alguns compostos e, por serem mais facilmente removidas e reutilizadas, essas fases são bastante atrativas para separações em escalas preparativas. O comportamento da separação nesse sistema depende não apenas da fase móvel e fase estacionária, mas também da natureza dos compostos separados (BONATO e JABOR, 2005).

2.5. Características da coluna cromatográfica quiral

Uma coluna cromatográfica quiral ideal deve apresentar boa estabilidade química frente à maioria dos solventes utilizados na fase móvel. O tamanho reduzido da partícula auxilia em separações difíceis, possibilitando a obtenção de picos cromatográficos melhores resolvidos e simétricos. Em cromatografia quiral é de grande importância a utilização de partículas de sílica de menores diâmetros para obter um processo de separação de alta eficiência e com reduzida

pressão. A coluna cromatográfica quiral deve apresentrar estabilidade mecânica e química e baixa queda de pressão, além de conter alta capacidade de carga da fase, geralmente atribuida à extensa área de superfície disponível e a alta densidade do ligante quiral (ROSA, 2005).

2.5.1. Método dos momentos

A análise dos momentos é uma ferramenta útil para determinação dos coeficientes de difusão axial e difusidade efetiva nos poros através de experimentos de pulsos cromatográficos (injeções no cromatógrafo) bem como para caracterização do leito e das partículas em torno de ε e ε_P. Assim como permite a possiblidade de obtenção das constantes de Henry para soluções diluídas. Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta a concentração do soluto na entrada do leito fixo. A análise de pulsos tem sido usada para estudar uma variedade de sistemas cromatográficos (ARNOLD et al., 1985a), baseada na teoria dos momentos estatísticos de Kubin (KUBIN, 1965). Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta conforme a Lei de Henry. A inclinação dessa reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, que se associa ao tempo de retenção do mesmo. Os parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento (MIYABE e SUZUKI, 1992; CREMASCO et al., 2001).

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n-ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é calculado pela Equação 2.1 (ARNOLD et al., 1985a; GUIOCHON et al., 1994).

$$M_n = \int_0^\infty c(t, z = L) t^n dt \qquad \textbf{(2.1)}$$

A Equação 2.2 representa o n-ésimo momento absoluto ou momento normalizado.

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^\infty c(t, z = L) t^n dt}{\int_0^\infty c(t, z = L) dt} \qquad \textbf{(2.2)}$$

E o n-ésimo momento central está representado pela Equação 2.3.

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, z = L)(t - \mu)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, z = L) dt} \qquad \textbf{(2. 3)}$$

O momento zero de um perfil de concentração de um pico eluente é simplesmente a área do pico. O primeiro momento absoluto (μ_1) está relacionado ao tempo de retenção do pico cromatográfico, e então com a força de adosrção (constante de equilíbrio). O segundo momento central (μ_2) fornece informações sobre a difusão e está relacionado ao espalhamento do pico. O primeiro (μ_1) e o segundo momento (μ_2) são dados pelas Equações 2.4 e 2.5 (ARNOLD et al., 1985b; RUTHVEN, 1984), onde L é o comprimento da coluna, u a velocidade superficial da fase móvel, ε a porosidade do leito, ε_P e a porosidade da partícula, He a constante de Henry, u_* a velocidade intersticial ($u_* = u / \varepsilon$), D_L e k_m os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa, respectivamente e K é dado pela Equação 2.6 (RUTHVEN, 1984).

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_*}\left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\varepsilon_p + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)(1-\varepsilon_p)He\right] = \frac{L}{u_*}\left\{1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)K\right\} \qquad \textbf{(2.4)}$$

$$\mu_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u_*}\left\{\frac{D_L}{u_*^2}\left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{K}\right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{Kk_m}\right\} \qquad \textbf{(2.5)}$$

onde

$$K = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p)He \qquad \textbf{(2.6)}$$

2.5.2. Porosidade

A porosidade total (ε_T) da coluna cromatográfica corresponde a todos os volumes disponíveis internos das partículas constituintes do material recheado. Em princípio a porosidade total da coluna (ε_T) pode ser obtida a partir da análise do comportamento do primeiro momento do composto inerte pela variação da velocidade superficial da fase móvel conforme a Equação 2.7, onde μ representa o primeiro momento, L o comprimento da coluna, u a velocidade

superficial da fase móvel, t_{inj} o tempo gasto para realizar a injeção, ε a porosidade do leito e ε_p a porosidade das partículas.

$$\mu = \frac{L}{u}\left[1+\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\varepsilon_p\right]+\frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u}\varepsilon_T + \frac{t_{inj}}{2} \qquad \textbf{(2.7)}$$

Na prática, há o problema de identificar se uma espécie química pode ser usada como composto inerte para determinação da porosidade total da coluna cromatográfica. O composto inerte deve apresentar interações reduzidas com a fase estacionária presente na coluna. O composto TTBB tem sido largamente utilizado como inerte para determinação da porosidade total em fases estacionárias quirais, devido ao seu tamanho molecular reduzido e ao fato de não apresentar qualquer tipo de interação com as FEQs (ROSA, 2005).

2.6. Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos são úteis para a avaliação da eficiência da separação na coluna cromatográfica, fornecendo informações referentes ao comportamento do composto entre a fase estacionária e a fase móvel. A Figura 2.17 apresenta um cromatograma com as definições das medidas para determinação dos parâmatros de separação cromatográfica.

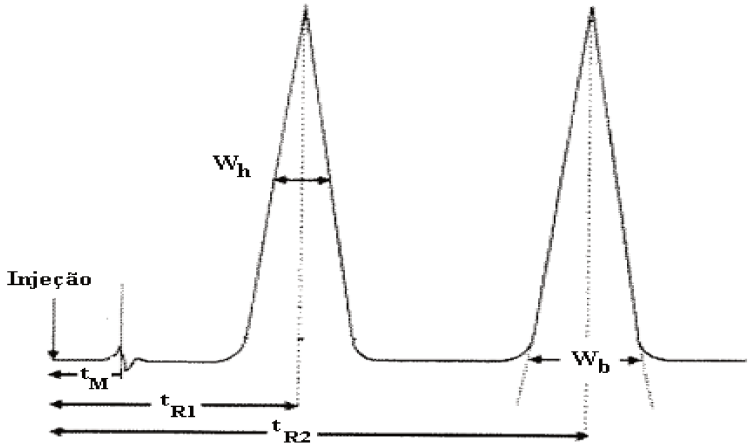


Figura 2.17 – Cromatograma teórico com as medidas para determinar os parâmetros cromatográficos.

2.6.1. Tempo de retenção

Por definiçao o tempo de retenção, t_R, é tempo decorrido do instante em que a amostra foi introduzida até o instante do máximo do pico (ARGENTON, 2010).

2.6.2. Fator de Retenção

O fator de retenção (k_i) é uma medida adimensional e de fundamental importância em separações cromatográficas. Pode ser determinado através da Equação 2.8, onde t_R é o tempo de retenção do composto e t_M é o tempo de retenção do composto não retido pela fase estacionária (CASS e DEGANI, 2001). O valor de k_i não deve ser muito pequeno, pois significa que o composto pouco interage com a fase estacionária, nem muito grande, por causar alargamento dos picos (DIAS,2007). Segundo ROSA (2005) para a farmacopéia americana o valor aceitável de k_i deve estar entre 1 a 8. Dentro dessa faixa é especificado o valor de 2 a 4 indicando uma razoável interação do soluto com a fase estacionária.

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_M} \qquad \textbf{(2.8)}$$

2.6.3. Fator de separação

O fator de separação (α) avalia a seletividade da separação para dois picos adjacentes. O valor de α é dependente da fase estacionária e/ou fase móvel, podendo assumir valores maiores ou iguais a unidade à temperaturas diferentes. Pode ser definido como uma razão entre os fatores de retenção do composto mais retido e do menos retido e calculado pela Equação 2.9 (CASS e DEGANI, 2001). Segundo ROSA (2005) o valor mínimo aceitável para o fator de separação, em uma separação razoável entre os compostos é de 1,2.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \qquad \textbf{(2.9)}$$

2.6.4. Resolução

A resolução (Rs) avalia a qualidade da separação. Está associada ao tempo de retenção e a largura dos picos cromatográficos dos dois compostos adjacentes. O valor de Rs pode ser determinado através da Equação 2.10, onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção para os dois compostos e w_{h1} e w_{h2} são as larguras dos picos a meia altura. (CASS e DEGANI, 2001).

$$Rs = 1{,}177 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad \textbf{(2.10)}$$

2.6.5. Número de pratos

O número de pratos (N_{pi}) é uma medida de eficiência da separação de um composto em uma fase estacionária, ou seja, é uma medida da capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito. Um prato ideal equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Para avaliação da eficiência da coluna cromatográfica são aceitos valores de número de pratos acima de 2000 na separação de fármacos. É o parâmetro que mais precisamente define a qualidade de um sistema cromatográfico. (DANTUS e WELLS, 2004; ARGENTON, 2010). O valor de N_{pi} pode ser determinado através da Equação 2.11, onde t_R é o tempo de retenção, e w_{hi} a largura do pico a meia altura. (CASS e DEGANI, 2001).

$$N_{pi} = 5{,}545\left(\frac{t_{R_i}}{w_{hi}}\right)^2 \quad \textbf{(2.11)}$$

2.7. Altura equivalente a um prato teórico (HETP)

A eficiência da separação de um processo cromatográfico aumenta à medida que o soluto flui através do leito recheado, devido ao maior número de interações do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. Uma etapa na qual a molécula alcança o equílibrio é equivalente a um estágio de equílibrio também designado por prato. A altura equivalente a um prato ($HETP$) avalia a eficiência de uma coluna cromatográfica sob determinadas condições de operação por

unidade de comprimento da coluna. O desempenho da coluna é medido através dos tempos de retenção e do alargamento dos picos obtidos a partir dos cromatogramas (CASS e DEGANI, 2001). Pequenos valores de *HETP* significa maior eficiência da coluna e altos valores de número de pratos teóricos (N_{pi}). A meta principal em cromatografia líquida é o alcance de pequenos valores de *HETP* para maximizar N_{pi} e elevar a eficiência da coluna. Em suma:

- *HETP* é menor em colunas recheadas com partículas pequenas, e para baixas taxas de velocidade da fase móvel;
- *HETP* é menor para fases móveis menos viscosas e para altas temperaturas de separação;
- *HETP* é menor para amostras de moléculas pequenas (SILVA JR, 2003).

A análise da dependência de *HETP* com a velocidade superficial da fase móvel (u) fornece informações relevantes a respeito do fenômeno de transferência de massa no sistema cromatográfico. Geralmente são assumidos quatro principais processos do fenômeno em colunas cromatográficas: (i) dispersão axial; (ii) transferência de massa do fluido para a partícula; (iii) difusão intraparticular; e (iv) adsorção/dessorção (MIYABE e GUIOCHON, 1999). O valor de *HETP* para uma coluna cromatográfica pode ser calculado através da equação van Deemter (Equação 2.12). Nessa equação, u representa a velocidade superficial da fase móvel, e A, B e C são constantes cinéticas determinadas experimentalmente e que incluem os efeitos de difusão turbilhonar, difusão longitudinal e transferência de massa fluido-sólido, respectivamente.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + uC \qquad \textbf{(2.12)}$$

O termo A da Equação 2.12, chamado de difusão turbilhonar refere-se aos diversos caminhos do fluxo que estão muito longe um dos outros. As moléculas que entram ao mesmo tempo na coluna podem ser eluídas em diferentes tempos, ocasionando alargamento do pico cromatográfico, conforme é mostrado na Figura 2.18.

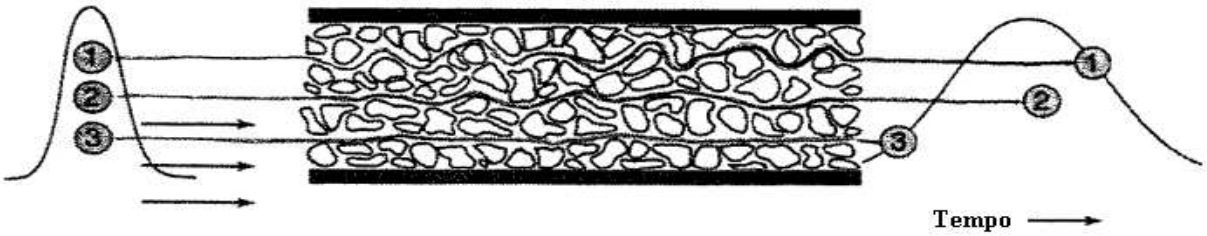


Figura 2.18 – Alargamento do pico cromatográfico a partir de diversos caminhos do fluxo.

O segundo termo da equação de van Deemter é referente à difusão longitudinal, na qual o soluto difunde do centro de maior concentração do pico para regiões mais diluídas na direção do fluxo. Quanto mais rápido a vazão da fase móvel, menor o tempo que o soluto fica na coluna e ocorre menor alargamento difusivo (Figura 2.19).

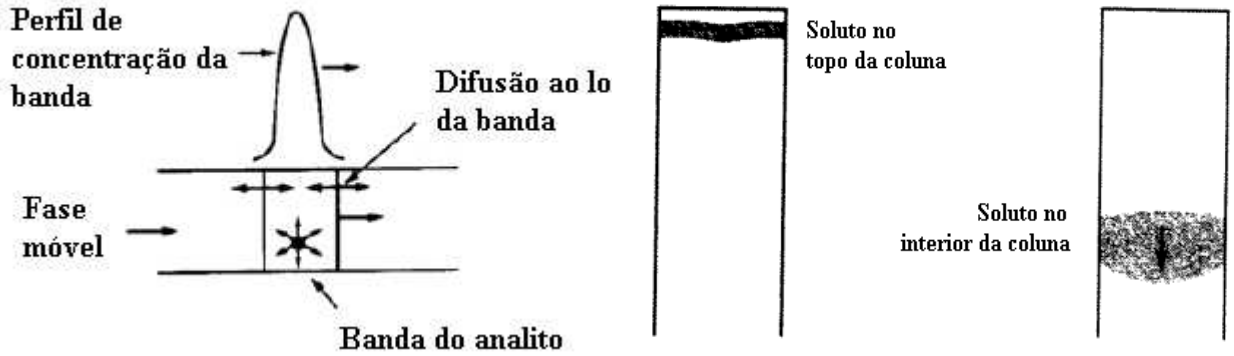


Figura 2.19 – Difusão longitudinal devido à difusão do soluto para as extremidades de concentração mais baixa (ROSA, 2005).

O terceiro termo da equação de van Deemter é referente à transferência de massa fluido-sólido, proveniente do limite de tempo necessário para o soluto estar em equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Quanto maior for o tamanho da partícula da fase estacionária e mais viscosa for a fase móvel, mais importante será este efeito (Figura 2.20) (GUIOCHON e LIN, 2003).

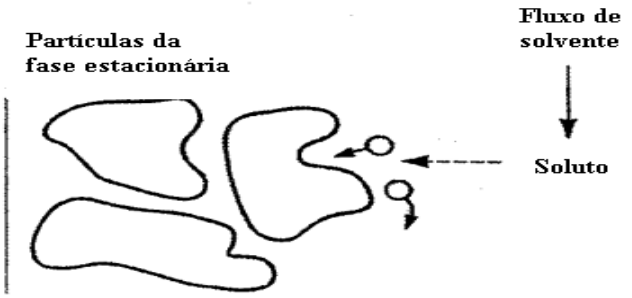


Figura 2.20 – Transferência de massa – efeito do tamanho da partícula e viscosidade da fase móvel (ROSA, 2005).

A Figura 2.21 apresenta uma curva hipotética da variação de *HETP* com a velocidade superficial da fase móvel (u). A curva representa um modo de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica. Na Equação 2.12 o primeiro termo representado pela curva A é independente da velocidade superficial. A dispersão devido à transferência de massa incompleta é uma função linear de u e é repesentada pela curva C. A dispersão longitudinal é inversamente proporcional a velocidade superficial e é representada pela curva B. A curva superior representa o perfil resultante de *HETP* versus u e apresenta um valor mínimo para altura dos pratos ($HETP_{mínimo}$) a uma dada velocidade superficial ótima ($u_{ótimo}$). Abaixo desta velocidade, *HETP* é fortemente dependente dos efeitos de difusão (termo B) e a altas velocidades é fortamente dependente do termo de transferência de massa (termo C) (SEWELL et al., 1987; ROSA 2005).

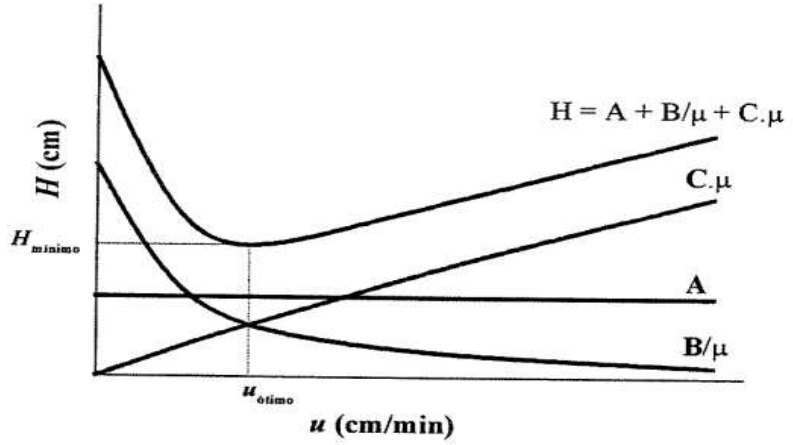


Figura 2.21 –Curva de van Deemter hipotética (ROSA, 2005).

Em um sistema com isoterma de adsorção linear, a eficiência da coluna cromatográfica é avaliada pela análise da *HETP*, podendo ser calculada através da Equação 2.13, onde N_{pi} corresponde ao número de pratos e L é o comprimento da coluna (GUICHON et al., 1994).

$$HETP = \frac{L}{N_{pi}} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L \qquad \textbf{(2.13)}$$

As fontes de ampliação dos picos cromatográficos de origem cinética incluem difusão molecular, difusão turbilhonar, as resistências de transferência de massa e da taxa finita da cinética de adsorção-dessorção. Assim, é importante estudar a difusão em meios porosos. RUTHVEN (1984) apontou que as taxas de adsorção e dessorção em adsorventes porosos são em geral controladas pela taxa de difusão dentro da rede de poros, mais do que pela cinética de adsorção-dessorção. Isto é especialmente verdadeiro em cromatografia, em que os adsorventes são preparados cuidadosamente para que apresentem uma energia moderadamente forte de fisissorção e nenhuma quimissorção. Em um leito empacotado, é impossível mover muito longe ao longo de uma linha reta sem bater na superfície de uma partícula. Os canais seguem caminhos tortuosos em torno das partículas. Ao modelar cromatografia, os fenômenos que contribuem para a mistura axial estão incluídos em um coeficiente de dispersão único axial. Os dois principais mecanismos que contribuem para a dispersão axial são a difusão molecular e difusão turbilhonar. Desta forma, a equação de van Deemter pode ser representada pela equação modificada que possui a forma representada pela Equação 2.14, onde k_m é o coeficiente de transferência de massa global e K corresponde ao termo relativo ao equilíbrio de adsorção, D_L é o coeficiente de dispersão axial e ε é a porosidade do leito (DUAN et al., 1998).

$$HETP = \frac{2D_L}{u} + 2u\left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{Kk_m}\left[1+\left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{K}\right]^{-2} \qquad \textbf{(2.14)}$$

onde

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \qquad \textbf{(2.15)}$$

em que D_m corresponde ao coeficiente de difusão molecular, d_p ao diâmetro da partícula e γ_1 e γ_2 são constantes que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5, respectivamente (RUTHVEN, 1984). A contribuição da difusão molecular axial (o primeiro termo da Equação 2.15) para o coeficiente de dispersão axial geralmente é desprezível perante o segundo termo. Portanto, a seguinte equação modificada de van Deemter pode ser derivada da Equação 2.12 (MIYABE e GUIOCHON, 1999):

$$HETP = A + Cu \tag{2.16}$$

onde os parâmetros A e C são representados por:

$$A = 2\frac{D_L}{u} \tag{2.17}$$

$$C = 2\left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{Kk_m}\left[1+\left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}\right)\frac{1}{K}\right]^{-2} \tag{2.18}$$

2.8. Isotermas de adsorção

Nos processos de separação por cromatografia, o comportamento no equilíbrio das espécies adsorvidas na fase estacionária é avaliado pela sua isoterma de adsorção que representa todas as forças de interações possíveis, atração ou repulsão, entre as moléculas do soluto e a fase estacionária (CAVAZZINI et al., 2001). O estudo de equilíbrio de fase é a parte da termodinâmica que descreve a composição de equilíbrio de duas fases e a influência de vários parâmetros nessa composição, como por exemplo temperatura e pressão.

O problema direto da cromatografia consiste no cálculo dos perfis de eluição dos componentes através de suas isotermas de adsorção. O problema inverso consiste na derivação da isoterma a partir dos perfis de eluição. Neste último caso, os dados de equilíbrio são obtidos de uma série de medidas cromatográficas nas quais as concentrações dos componentes são sistematicamente ajustadas (FELINGER et al., 2003). Foi demonstrado que a termodinâmica controla perfis de bandas, particularmente a altas concentrações e quando a cinética de transferência de massa não é muito lenta. Para misturas de multicomponentes, a complexidade na

determinação de isotermas competitivas resulta da competição que há entre os diferentes componentes por interações com a fase estacionária. A quantidade de um componente adsorvido em equilíbrio com a solução quase sempre diminui com o aumento da concentração do outro componente adsorvido. Isto ilustra o caráter competitivo da isoterma com dois componentes (GUIOCHON et. al, 1994).

Em cromatografia linear, os efeitos de dispersão axial e os processos de transferência de massa são os principais responsáveis pelo grande alargamento dos picos cromatográficos, ao passo que, em cromatografia preparativa, estes efeitos são menos importantes. Assim, o conhecimento da isoterma frequentemente contribui para explicar o mecanismo de retenção e pode ajudar a propor rotas visando melhorar a separação, predizer a taxa de produção e, até mesmo, a extensão da purificação. Logo, são de interesse particular para separações enantioméricas (MIHLBACHLER et al. 2002).

De acordo com GRITTI e GUIOCHON (2005), alguns testes devem ser sucessivamente aplicados para encontrar o modelo de isoterma que melhor representa os dados experimentais. O processo de seleção reduz, por eliminação, a quantidade de modelos que descrevem determinado sistema. O primeiro teste consiste em plotar o gráfico de Scatchard (q/c versus q), onde os modelos de isotermas podem ser classificados de acordo com a forma do gráfico obtido. Por exemplo, gráficos de Scatchard convexos para baixo representam os modelos de bi-Langmuir, Langmuir-Freundlich e Tóth e gráficos convexos para cima representam os modelos de Jovanovic e Fowler. Apenas o modelo de Langmuir apresenta um gráfico de Scatchard linear. O segundo teste envolve a correlação dos modelos de isotermas selecionados aos dados de equilíbrio, através da análise de regressão utilizando o algoritmo Marquardt, o qual minimiza a soma dos quadrados dos resíduos da diferença entre os dados experimentais e os dados calculados com o modelo. Em seguida, o parâmetro Fischer é calculado para selecionar os melhores modelos e o teste F utilizado para avaliar estatisticamente qual modelo melhor representa os dados experimentais. O terceiro teste compara os modelos de isotermas remanescentes com os resultados do cálculo da distribuição da energia de adsorção, a qual mostra se a distribuição é unimodal (Langmuir e Tóth) ou multimodal (bi-Langmuir). Se após a terceira etapa ainda existir mais de um modelo que represente os dados experimentais, deve ser feita uma

comparação entre os perfis de eluição, calculados e experimentais, em baixas e altas concentrações. No entanto, se nenhuma diferença significativa for encontrada entre estes modelos, a escolha final deverá ser baseada no significado físico dos parâmetros das isotermas.

2.8.1. Modelo de Langmuir

A isoterma de Langmuir é a mais freqüentemente usada como modelo de adsorção, onde típicos efeitos de competição sob condições de sobrecarga em cromatografia não-linear podem ser ilustrados. Considera que o processo acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio até que a cobertura da monocamada seja atingida (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; JAMES et al., 1999). É o modelo mais comumente utilizado para analisar isotermas de equilíbrio não-lineares (FORNSTEDT et al., 1999; JAMES et al., 1999).

$$q_i = \frac{a_i\ c_i}{1+\sum b_i c_i} = \frac{b_i\ q_s\ c_i}{1+\sum b_i c_i} \qquad \textbf{(2.19)}$$

equação na qual q_1 é a quantidade adsorvida de componente i na fase sólida, c_i é a concentração do componente i na fase líquida, b_i é a constante de equilíbrio de adsorção, relacionada a energia de adsorção, $q_s = (a_i / b_i)$ é a capacidade de saturação do adsorvente e $a_i = (q_s\ b_i)$ é o coeficiente de distribuição, também chamado de constante de Henry em baixas concentrações de soluto $(a_i = He_{0,i} = dq_i / dc_i\big|_{c\to 0})$. A grande vantagem desse modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua dedução. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever a adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação (FELINGER et al., 2003).

Diversos métodos experimentais para a determinação de isotermas de adsorção para um único componente e para multicomponentes - isotermas competitivas - têm sido reportados na literatura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Esses métodos podem ser classificados em estáticos ou dinâmicos (GUIOCHON et al., 1994; JAMES et al., 1999; RUTHVEN, 1984). Os

métodos estáticos para determinação de isotermas não analisam a curva concentração-tempo, apenas utilizam informações no estado de equilíbrio. Os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática das curvas resposta que correspondem às mudanças bem definidas na alimentação da coluna cromatográfica ao longo do tempo (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Métodos dinâmicos são implementações dedicadas à cromatografia e que foram desenvolvidos durante os últimos 50 anos. Esses métodos incluem a análise frontal (AF), análise frontal por pontos característicos (AFPC), eluição por pontos característicos (EPC), métodos de perturbação (MP) e método inverso (MI) (JAMES et al., 1999).

2.8.2. Método por análise frontal

É uma variante do método dinâmico na determinação de isotermas, sendo a mais usada, pela sua precisão e relativa simplicidade. No entanto, este método consome uma elevada quantidade de soluto (MIHLBACHLER et al., 2002). O método refere-se à determinação de isotermas a partir das curvas de ruptura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Pode ser realizado pelo método do pulso ou pelo método de degraus consecutivos (BURGER et al., 2000; SUN et al., 2001).

No primeiro método, a coluna inicialmente em equilíbrio com a fase móvel, é alimentada com uma solução de concentração conhecida contendo o soluto, até a sua saturação. Em seguida, a coluna é alimentada apenas com a fase móvel, o soluto é removido e o equilíbrio novamente atingido. A massa adsorvida em cada curva de ruptura é calculada independentemente das outras curvas, o que elimina o acúmulo de erros. Esse procedimento é repetido sucessivas vezes gerando sucessivas curvas de ruptura, as quais cada curva corresponde a um ponto experimental na isoterma de adsorção competitiva (BURGER et al., 2000; GRITTI e GUIOCHON, 2003; GUIOCHON et al., 1994; JACOBSON et al., 1987; SUN et al., 2001).

O segundo modo de injeção consiste no aumento da concentração da solução contendo o soluto, em intervalos de tempo apropriados, até a saturação da coluna. A composição do soluto em cada platô é determinada da análise do eluente em um segundo sistema cromatográfico. Neste método, não há regeneração da coluna entre duas etapas consecutivas e os erros são propagados de etapa para etapa, uma vez que, a massa adsorvida na etapa $i+1$, depende do valor da massa

adsorvida na etapa anterior, i (BURGER et al., 2000; GRITTI e GUIOCHON, 2005; SUN et al., 2001).

Os perfis de concentração, de um único componente e de uma mistura binária, obtidos pelo método da análise frontal em um único degrau são apresentados nas Figuras 2.22 e 2.23. Na Figura 2.22, as áreas A_1 e A_2 representam a massa de soluto na fase móvel fora e dentro da coluna cromatográfica, respectivamente. O volume referente à área A_1 é denominado volume morto do sistema, V_M, e o volume referente à área A_2 é denominado volume morto da coluna, V_0 ($V_0 = V_C \ .\varepsilon_T$). A área A_3 representa a massa de soluto adsorvida na fase estacionária e a área A_4 corresponde à massa de soluto que sai da coluna durante o tempo do experimento (GRITTI e GUIOCHON, 2005; LAI e LIN, 1999; SAMUELSSON et al., 2008).

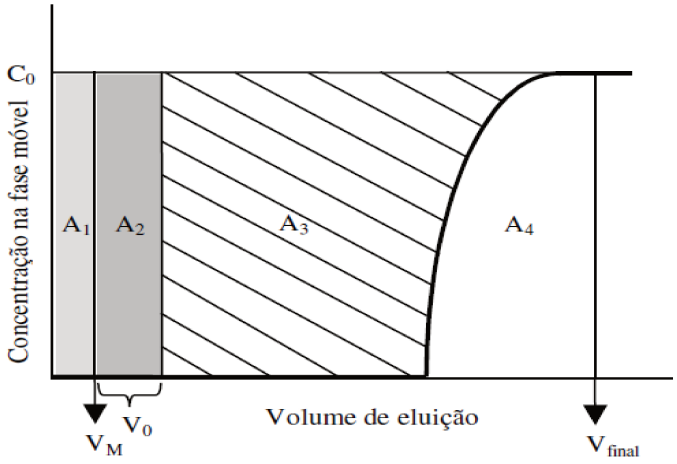


Figura 2.22 – Perfil de eluição de um único componente obtido pelo método da análise frontal (Adaptado de GRITTI e GUIOCHON, 2005).

Consequentemente, a concentração de soluto adsorvido na fase estacionária (q_i) em equilíbrio com uma dada concentração de soluto na fase móvel (c_i) é dada pela Equação 2.20 (CAVAZZINI et al., 2003; CHERRAK et al., 2000; GRITTI e GUIOCHON, 2005; PIATKOWSKI et al., 2003):

$$q_i = \frac{A_3}{V_C - V_0} = \frac{c_i (V_1 - V_T)}{V_{ads}} \qquad \textbf{(2.20)}$$

onde, V_C é o volume da coluna, V_1 é o volume de retenção do ponto de inflexão da curva de ruptura, V_T é o volume morto total, volume morto do sistema mais o volume morto da coluna, e V_{ads} é o volume de adsorvente.

A curva de ruptura para uma mistura binária tem duas ondas separadas pelo platô intermediário como apresentado na Figura 2.23, cuja largura diminui com o aumento da concentração de ambos os componentes na fase móvel (BURGUER et al., 2000; SUN et al., 2001). Considerando apenas a etapa de adsorção, em $t < 0$, a coluna é inicialmente condicionada com uma solução na qual a concentração dos componentes 1 e 2 são $c_{1,a}$ e $c_{2,a}$, respectivamente. Em $t = 0$ essas concentrações são alteradas para $c_{1,b}$ e $c_{2,b}$, promovendo a elevação de duas frentes com volumes de retenção iguais a V_1 e V_{1+2}, os quais são determinados do ponto de inflexão da curva de ruptura. As concentrações dos componentes no platô intermediário, formado entre as duas frentes na etapa de adsorção, são $c_{1,pi}$ e $c_{2,pi}$. Apenas o enantiômero menos retido é eluído nesse platô na etapa de adsorção. Na etapa de dessorção, o platô intermediário é referente ao enantiômero mais retido (MIHLBACHLER et al., 2002b). O segundo platô é composto pelos dois enantiômeros e suas concentrações são iguais à da amostra injetada (JACOBSON et al., 1987).

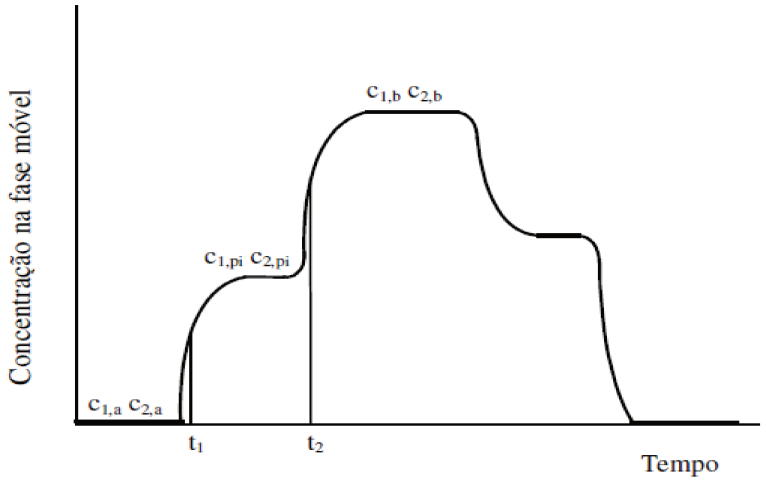


Figura 2.23 – Perfil de eluição de uma mistura binária obtido pelo método da análise frontal (Adaptado de LAI e LIN, 1999).

Os dados experimentais para a determinação das isotermas de adsorção podem ser obtidos da etapa de adsorção ou dessorção da curva de ruptura, segundo as Equações 2.21 e 2.22. A concentração de cada componente adsorvido na superfície do adsorvente é determinada do volume de retenção das duas frentes da curva e da composição de cada componente nos platôs intermediários (CHERRAK et al., 2000; JACOBSON et al., 1987; MIHLBACHLER et al., 2002b).

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_{1+2} - V_1)(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad \textbf{(2.21)}$$

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_{1+2} - V_{1,des})(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad \textbf{(2.22)}$$

onde $V_{1,des}$ é o volume de retenção da primeira frente da curva de ruptura na etapa de dessorção.

Quando se trabalha com altas concentrações, surgem desvios da linearidade e interações competitivas entre os diferentes componentes da alimentação, havendo necessidade de modelos mais complexos descreverem o comportamento dos resultados experimentais (GUIOCHON et al., 1994). Desta forma, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por relações como as descritas por alguns dos modelos seguintes:

2.9. Análise termodinâmica de adsorção

O estudo termodinâmico é uma estratégia que tem sido amplamente empregada para explicar o mecanismo de retenção enantiomérica em fase estacionária quiral já que o processo de separação direta dos enantiômeros S e R pode ser caracterizado pelas propriedades termodinâmicas ΔG, ΔH e ΔS. Separações cromatográficas quirais são determinadas pela diferença de energia livre de adsorção dos enantiômeros e essa diferença pode ser calculada a partir da seletividade, onde k_R e k_S são as constantes de associação relativas às configurações R e S do enantiômero (SCHLAUCH e FRAHM, 2001; AHUJA, 2000; FORNSTEDT et al., 1997; SCHURIG, 1994; PIRKLE, 1991):

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT\ln\left(\frac{k}{\phi}\right) \quad \textbf{(2.23)}$$

onde k é o fator de retenção do soluto, ϕ a razão de fase na coluna (volume de fase estacionária pelo volume de fase móvel), R a constate universal dos gases e T a temperatura absoluta. Expressando a energia de Gibbs de acordo com mudanças na entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0), o fator de retenção passa a depender da temperatura de acordo com a Equação 2.24.

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln\phi \quad \textbf{(2.24)}$$

Assumindo que ΔH^0 e ΔS^0 são constantes dentro de uma faixa de temperatura relevante, o gráfico de $\ln k$ em função de $1/T$ é capaz de fornecer os valores de ΔH^0 e ΔS^0 a partir da inclinação e da interseção com o eixo da ordenada, $(\Delta H^0/R)$ e $[(\Delta S/R)+\ln\phi]$, respectivamente. O termo ΔS^* é utilizado para substituir a expressão $(\Delta S/R)+\ln\phi$. Em cromatografia quiral, entretanto, os gráficos de van't Hoff podem apresentar desvios da linearidade devido a não-homogeneidade da superfície da FEQ causada por mecanismos de retenção distintos e, como conseqüência, os cálculos das propriedades termodinâmicos podem ser realizados de forma errada (SCHLAUCH e FRAHM, 2001; SCHURIG, 1994). O comportamento linear será obedecido desde que não haja alterações de conformação da fase estacionária. Gráficos não-lineares são obtidos para fases estacionárias que apresentam superfícies heterogêneas ou que sofram mudanças devido à temperatura (ROSA, 2005; DIAS,2007).

A partir da diferença de energia livre de Gibbs (Equação 2.23) para os dois enantiômeros, pode-se definir o termo $\Delta(\Delta G^0)$. Este é responsável pela maior retenção do segundo enantiômero na fase estacionária quiral (BERTHOD et al. 2004). Diferentes interações entre os dois enantiômeros e a fase estacionária podem ser expressas como a diferença em energia molar para os dois enantiômeros, calculadas a partir do fator de separação (α) através da Equação 2.25.

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta G^0)}{RT} = -\frac{\Delta(\Delta H^0)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R} \quad \textbf{(2.25)}$$

Os termos $\Delta(\Delta G^0)$, $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ representam as diferenças de energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, respectivamente. No caso de separações quirais, o fator de separação (α) é o fator primordial que determina a diferença relativa de retenção dos dois enantiômeros (BERTHOD et al., 2004).

A certa temperatura, a temperatura isoenantiosseletiva (T_{iso}),o termo entálpico é compensado pelo termo entrópico, conduzindo a uma completa perda de separação quiral ($\Delta\Delta G^\circ = 0$). Acima da T_{iso} a separação melhora com a ordem de eluição dos enantiômeros invertida e assim a enantioseletividade é dominada pelo termo entrópico (CIRILLI e LA TORRE, 1998).

$$T_{iso} = \frac{\Delta(\Delta H^0)}{\Delta(\Delta S^0)} \quad \textbf{(2.26)}$$

2.10. Sobrecarga da coluna

Os perfis de eluição em condições de sobrecarga são muito sensíveis às isotermas de adsorção. Em altas concentrações, os picos cromatográficos são fortemente influenciados pela termodinâmica de equilíbrio de fase, isto é, a influência do comportamento não linear da isoterma de adsorção possui uma forte predominância com relação à influência da cinética de transferência de massa (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Uma coluna cromatográfica pode atingir a condição de sobrecarga quando a amostra é pouco solúvel na fase móvel ou o volume de injeção é elevado para as dimensões da coluna; alta concentração da amostra e amostra que são dissolvidas em solventes com elevada característica de solvatação quando comparada à fase móvel.

Quando a sobrecarga da coluna é considerada, dois procedimentos podem ser realizados. O primeiro, sobrecarga de concentração, considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com o

aumento da concentração da soluçao injetada é esperado que os picos cromatográficos sejam muito distorcidos chegando a ter forma de um triângulo. Pode ocorrer o aumento de cauda do pico cromatográfico. O segundo tipo de sobrecarga – sobrecarga de volume- considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. A partir de uma solução concentrada, preparada para faixa de solubilidade do analito na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico. O aumento do volume de injeção, dentre outros fatores como a força do solvente usado para diluição, pode resultar na deformação do pico. Os picos cromatográficos são mais simétricos e a partir de um certo volume de injeção a altura do pico pode manter-se constante (MARCHERY-NAGEL, 2001).

2.11. Cromatografia preparativa em leito móvel simulado

Nos últimos anos, a cromatografia preparativa tem aumentando sua importância como um processo de separação, purificação e recuperação nas indústrias farmacêutica, agroquímica e de alimentos, em que as técnicas clássicas como a destilação e evaporação não são possíveis. Muitas aplicações envolvem a cromatografia preparativa em batelada; contudo, notáveis inovações foram alcançadas graças ao desenvolvimento da cromatografia contínua em larga escala, cujas vantagens são significativas em termos de desempenho do processo (SARTOR, 2006).

A cromatografia preparativa enfocada na tecnologia de leito móvel simulado (LMS), é atualmente uma das mais importantes técnicas de separação quiral na indústria farmacêutica (ZHANG et al., 2004). Desde que foi patenteado em 1960 pela Universal Oil Products (UOP), tem encontrado cada vez mais novas áreas de aplicação, com especial ênfase na indústria de química fina (AZEVEDO et al., 1999). O crescente interesse por esta técnica está associado à maior produtividade, ao menor custo de operação e à possibilidade em se obter produtos mais concentrados em tempos relativamente curtos quando comparada à cromatografia em batelada (FRANCOTTE et al., 1998). As vantagens do emprego do LMS frente à cromatografia em batelada, podem ainda ser ampliadas nos quesitos que seguem (SCHULTE e STRUBE, 2001):

· Maior produtividade,

· Menor custo de operação,

· Produtos mais concentrados.

Mesmo para separações em maiores escalas, em que o baixo custo de operação supera o alto custo fixo, o custo global de separação de uma unidade de leito móvel torna-se menor perante a cromatografia convencional (ZHANG et al., 2004).

Cromatografia em LMS é uma técnica promissora para a produção industrial de fármacos enantioméricos individuais, capaz de competir com outros métodos até agora dominantes, como a cromatografia em batelada, cristalização diastereoisomérica ou síntese assimétrica (AZEVEDO et al., 1999). A idéia básica de um sistema com leito móvel é promover um contato contracorrente entre as fases sólida e líquida, visando maximizar a transferência de massa no processo. As grandes vantagens do contato contracorrente entre as fases estacionária (fase sólida) e a móvel (fase líquida) são a alta produtividade, o baixo consumo de solvente e um aumento na performance de separação, gerando uma elevada recuperação do produto com elevado grau de pureza, mesmo quando a seletividade é próxima da unidade ou a eficiência da fase estacionária é baixa (TACHIBANA e OHNISHI, 2001; WANG e WENSLOW, 2003).

A compreensão do processo LMS depende necessariamente da observação de um outro processo, o processo de leito móvel verdadeiro (LMV). O processo de LMV é um processo cromatográfico no qual, ao contrário dos processos tradicionais de leito fixo, a fase sólida adsorvente se move em contracorrente a fase líquida. A vantagem desse tipo de movimento está na sua propriedade de aumentar a força motriz da separação, como acontece em um trocador de calor, aumentando assim a eficiência de utilização do adsorvente (SANTOS, 2004). Na operação do LMV ideal (Figura 2.24), os fluxos de fase líquida e sólida estão em direções opostas e são continuamente reciclados, ou seja, a fase líquida que deixa a zona 4 é reciclado para a zona 1, enquanto que a fase sólida saindo da zona 1 é reciclado para a zona 4. A alimentação é injetada entre as zonas 2 e 3 e duas linhas de produtos podem ser continuamente coletadas: o extrato, rico no composto mais retido e, então, preferencialmente transportado com a fase estacionária (fase sólida); e o refinado, espécie menos retida que move juntamente com a fase móvel (fase líquida). Com relação ao eluente puro, este é injetado continuamente no início da zona 1 com o líquido reciclado do final da zona 4.

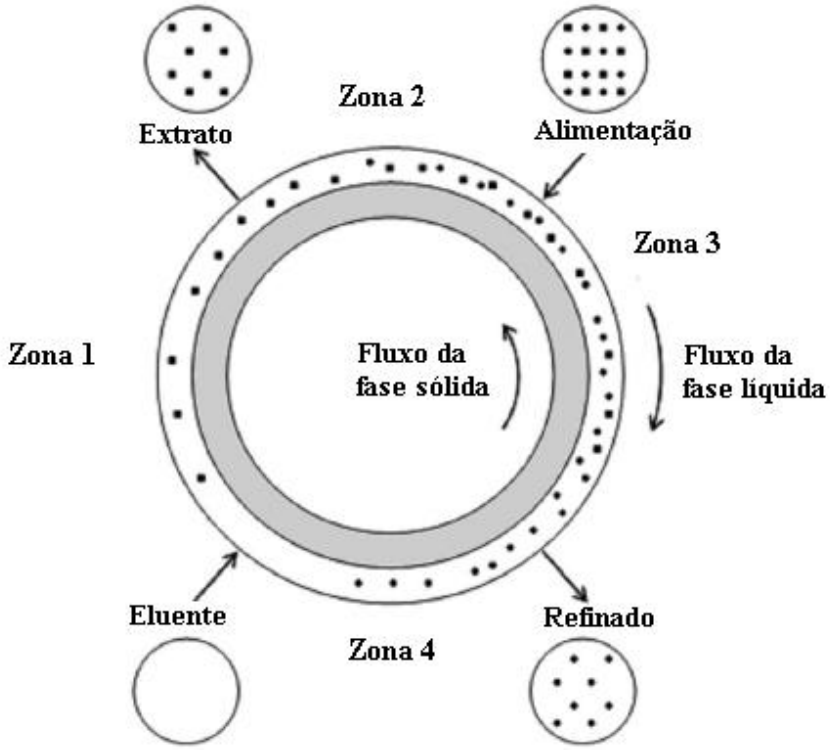


Figura 2.24 - Diagrama esquemático de operação do sistema leito móvel verdadeiro (LMV). (●) Composto menos retido – refinado; (■) Composto mais retido – extrato. Adaptado de COX (2005).

A unidade LMV é dividida em quatro zonas: zona 1, que se inicia na entrada do eluente e termina no ponto de retirada do extrato; zona 2, iniciada após o ponto de retirada do extrato e finalizada antes da entrada da alimentação; zona 3, que se inicia com a entrada da alimentação e termina no ponto de retirada do refinado; e, por fim, a zona 4, que se estende desde o ponto de retirada do refinado até o ponto de entrada do eluente. Durante a operação do LMV, a vazão de sólido é constante em toda a unidade. Contudo, devido aos pontos de injeção e coleta, a vazão de líquido difere de zona para zona, e estas, por sua vez, apresentam diferentes funções.

Nas zonas 2 e 3, os dois componentes (A e B) movem-se em direções opostas. O componente menos retido (A) deve ser dessorvido e transportado com a fase líquida (fase móvel), ao passo que o composto mais retido (B) deve ser adsorvido e transportado com a fase sólida (fase estacionária). Considerando que nestas zonas o objetivo é evitar a contaminação das

correntes de extrato e refinado, então se pode dizer que a zonas 2 e 3 correspondem às zonas de dessorção de A e adsorção de B, respectivamente. Na zona 4, ambos os componentes devem ser adsorvidos a fim de se regenerar o eluente que será reciclado para a primeira zona. Como o componente A é a espécie menos retida, as condições para a adsorção deste componente também possibilita a de espécies mais retidas. Por outro lado, a zona 1 caracteriza-se como a zona de regeneração do sólido, cujos componentes A e B podem ser dessorvidos a fim de se obter uma fase estacionária livre dessas espécies. Sendo o componente B a espécie mais retida, sua condição de dessorção permite também dessorver A (COX, 2005).

A configuração LMV não é um esquema eficiente de processo porque a movimentação da fase sólidA muitas vezes não acontece da forma desejada. Para que se aproveitem as vantagens do escoamento em contracorrente, que maximiza a força motriz da separação, é necessário que a fase sólida flua de forma ordenada, ou seja, num fluxo aproximadamente empistonado. No entanto, a fase sólida adsorvente pode consistir em um pó muito fino que tem a tendência de se agitar mais do que deveria, ocorrendo um desvio do tipo de fluxo que seria o ideal, desvio este conhecido por retromistura (*backmixing*). A movimentação da fase sólida também leva à erosão das partículas e a problemas de atrito (MAZZOTTI et al., 1996). Portanto, para vencer estes obstáculos, lança-se mão do Leito Móvel Simulado (LMS), desenvolvido justamente para manter as vantagens do processo contínuo contracorrente sem introduzir os problemas associados ao movimento da fase sólida (RODRIGUES e PAIS, 2004).

O LMS consiste no arranjo de várias colunas de leito fixo em que o processo contracorrente entre as fases sólida e líquida é simulado por mudanças periódicas das posições de entrada e saída na direção do fluxo da fase líquida. Desta forma, a fase sólida não se move e perfis de concentração são alcançados no interior de cada coluna. Tão logo os pontos de alimentação e retirada seguem estes perfis, pode-se gerar um estado estacionário cíclico em que a migração das frentes de adsorção se repete a cada tempo de troca da mesma forma (SARTOR, 2006). O surgimento do LMS superou as inconveniências da cromatografia líquida convencional em batelada e proporcionou a aplicação industrial das técnicas cromatográficas. Exemplos de estudos recentes incluem a separação de enantiômeros (MINCEVA et al., 2003; WANG e CHING, 2004; SANTOS et al., 2004; RAJENDRAN et al., 2005; VEREDAS et al., 2006),

processamento de açúcares (MALLMANN et al., 1998; AZEVEDO e RODRIGUES, 2001; BUBNIK et al., 2004), purificação de aminoácidos e proteínas (XIE et al., 2000; CREMASCO E WANG, 2003; MOLNÁR et al., 2004; MOLNÁR et al., 2005), separação de ácidos orgânicos (LEE et al., 2004) e separação de isômeros ópticos derivados de petróleo (SILVA et al., 2004; KURUP et al., 2005).

2.11.1. Projeto das condições de operação do leito móvel simulado

A seleção das condições operacionais do LMS não é uma tarefa simples e direta, pois depende de cada processo de separação em particular, sendo função de informações sobre o equilíbrio e aspectos de transferência de massa.O principal problema consiste na escolha correta das vazões de sólido (representadas pelo tempo de troca das posições de alimentação e retirada) e líquido (RODRIGUES e PAIS, 2004). Deve-se ter em mãos estes parâmetros antes mesmo da partida da unidade. Nisto estão inseridos a determinação das vazões de alimentação da amostra e de dessorvente e as vazões de retirada de refinado e extrato, além do tempo de troca das posições das correntes no sistema. Projetadas para obter alta produtividade de separação, as unidades LMS muitas vezes operam com alta concentração de alimentação, o que leva a comportamentos não lineares na adsorção competitiva dos enantiômeros. Por isso, ferramentas de modelagem e simulação são de importância crucial antes da realização de experimentos no sistema. Diferentes técnicas para a obtenção destes parâmetros são reportadas na literatura, podendo-se destacar o método do triângulo, o método dos volumes de separação, o conceito de ondas estacionárias, e, finalmente, o método do atalho. O método do triângulo, apesar de sua maior difusão na literatura, não é capaz de unir, nas condições de operação, a pureza do produto desejado com as vazões e comprimentos das zonas de separação e com os parâmetros de transferência de massa, pois estes e os efeitos de dispersão axial são negligenciados. Logo, a metodologia pode ser aplicada visando obter apenas uma suposição inicial para a otimização do LMS. Por outro lado, a metodologia dos volumes de separação, também fundamentada na teoria do equilíbrio, aprimora o método do triângulo, visto que são considerados os efeitos de transferência de massa e a importância das vazões nas zonas I e IV da unidade LMS ao se determinar a região completa de separação. O conceito das ondas estacionárias, por sua vez, foi desenvolvido com o intuito de superar as desvantagens apontadas pelos métodos baseados na teoria do equilíbrio, pois une a pureza e a

recuperação de produtos à dispersão axial, às resistências à transferência de massa, aos comprimentos e velocidades superficiais das zonas de separação e à velocidade do leito móvel, fornecendo bom desempenho e menor consumo de solvente. Por outro lado, a sua implementação é mais complexa do que as citadas no parágrafo anterior. Finalizando, o método *shortcut*, torna-se o mais simples, prático em termos de implementação, uma vez que os parâmetros operacionais de uma unidade LMS podem ser determinados por testes de pulsos longos em diferentes vazões, sem o conhecimento prévio dos parâmetros de transferência de massa e da isoterma de adsorção.

2.11.1.1. Método *shortcut* ou do atalho

O método do atalho caracteriza-se como uma estratégia empírica para a obtenção dos parâmetros operacionais de uma unidade LMS (MALLMANN et al., 1998; MIGLIORINI et al., 2002; XIE et al., 2003). Sua aplicação depende apenas da análise da distribuição de concentração dos componentes de uma mistura binária, geradas a partir de testes de pulso longo (alta quantidade de soluto) em vazões distintas. O pulso longo corresponde a injeção de amostra até a saturação das colunas. São utilizadas quatro colunas em série para obtenção do pulso longo. A obtenção dos parâmetros da isoterma de adsorção e de transferência de massa para cada componente torna-se desnecessária, impondo ao método maior praticidade e aplicações em sistemas não ideais de separação.

Os parâmetros operacionais são determinados através de um conjunto de equações, descritas abaixo, das quais são obtidas as vazões volumétricas para as diferentes zonas de separação envolvidas na unidade. A vazão de alimentação (Q_F) deve ser atribuída para o sistema de separação.

$$Q^I = \frac{(\upsilon - y_6)}{x_6} \qquad \textbf{(2.23)}$$

$$Q^{II} = Q^{III} - Q_F \qquad \textbf{(2.24)}$$

$$Q^{III} = \frac{(L^{III} - L_C) - y_4}{x_4} \qquad \textbf{(2.25)}$$

$$Q^{IV} = \frac{\upsilon}{x_1} \tag{2.26}$$

$$\upsilon = x_2 Q^{III} \tag{2.27}$$

$$Q^{II} = \frac{\upsilon - y_5}{x_5} \tag{2.28}$$

Em tais equações, os coeficientes x_n e y_n são obtidos por meio de regressões lineares das velocidades de *onda de choque* (u_{sh}) e de *onda de difusão* (u_D) e do comprimento das *zonas de transferência de massa* (L_{ZTM}) em função da vazão. Sendo que u_{sh} e u_D são obtidas pela relação entre o comprimento efetivo do leito e os tempos de inflexão ($t_{\text{inf } lexão}$) e a 5% do platô de concentração ($t_{5\%}$), respectivamente; ao passo que o L_{ZTM} é obtido pelo produto entre a u_{sh} e o tempo médio associado ao intervalo de 5-95 % (Δt) das curvas de concentração, conforme disposto na Figura 2.25.

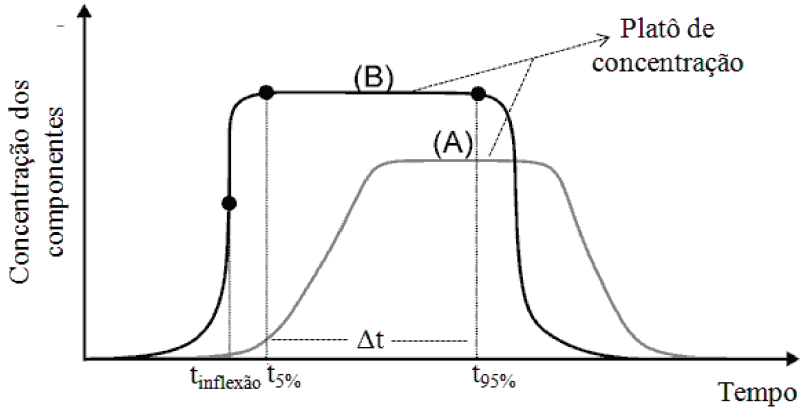


Figura 2.25 – Perfis de concentração obtidos por testes de pulso longo. (A) componente mais retido; (B) componente menos retido.

A literatura reporta diversos trabalhos envolvendo a aplicação direta do método, como separações cromatográficas de enantiômeros, descrita por MIGLIORINI et al. (2002) e de misturas de aminoácidos, apresentada por XIE et al. (2003).

Capítulo 3

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos materiais e a metodologia empregada para a realização dos experimentos. Serão descritos os métodos aplicados para definição da faixa de comprimento de onda utilizada, a escolha da fase móvel e a ordem de eluição dos enantiômeros. A metodologia no desenvolvimento da separação cromatográfica foi divida nos experimentos com soluções diluídas para as determinações de parâmetros hidrodinâmicos, de transferência de massa e de equilíbrio de adsorção linear; e nos experimentos com soluções concentradas para obtenção das isotermas de adsorção e estudo da sobrecarga na coluna.

3.1. Materiais

3.1.1. O secnidazol

O secnidazol racêmico utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela empresa EMS® (Hortolândia, SP). Apresenta massa molar de 185,18 g/gmol, sendo constituído pelos enantiômeros R-(-) e S-(+).

A Figura 3.1 apresenta a estrutura química do secnidazol.

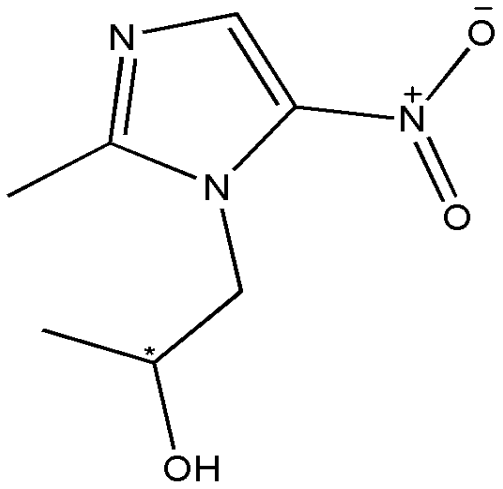


Figura 3.1 – Estrutura química do secnidazol. O símbolo (*) indica o esterocentro da molécula.

Foi realizada uma varredura no espectro de absorção no ultravioleta com a solução de secnidazol diluida na fase móvel, para determinar o máximo e mínimo de absorção na região do espectro.

3.1.2. Traçador

O composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB), cuja estrutura molecular está apresentada na Figura 3.2, foi adquirido da Sigma-Aldrich® (EUA). O TTBB é uma molécula relativamente pequena, apresenta massa molar de 264,44 g/gmol e não é retida na FEQ, sendo capaz de se difundir não somente através do leito, mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso. Por ser inerte este composto tem sido utilizado como traçador na determinação da porosidade para vários tipos de FEQs (SARTOR, 2006).

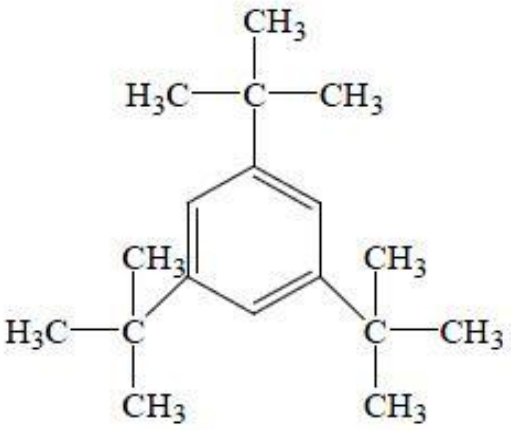


Figura 3.2 – Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB).

3.1.3. Fase estacionária

De acordo com SILVA JR (2009), atualmente, grande parte das separações enantioméricas em escalas preparativas e semi-preparativas têm sido executadas em fase estacionária quiral (FEQ) baseadas em polissacarídeos, tais como celulose e amilose. Pois a capacidade de saturação deste tipo de FEQ foi reconhecida por ser um importante recurso na obtenção de elevados valores de produtividade. Em virtude disso, no presente trabalho, foi utilizada coluna cromatográfica de aço inoxidável recheada com a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Figura 3.3). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa denominada comercialmente como Chiralpak® AD (100 x 10 mm) com diâmetro médio de 20 µm, adquirida da empresa Chiral Technologies® (Tóqio, Japão) para estudos de separação de misturas racêmicas de secnidazol diluídas e concentradas, e uma coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm) com diâmetro médio de 10 µm, adquirida da empresa Chiral Technologies® (Tóqio, Japão), utilizada nos experimentos de desenvolvimento do método de separação.

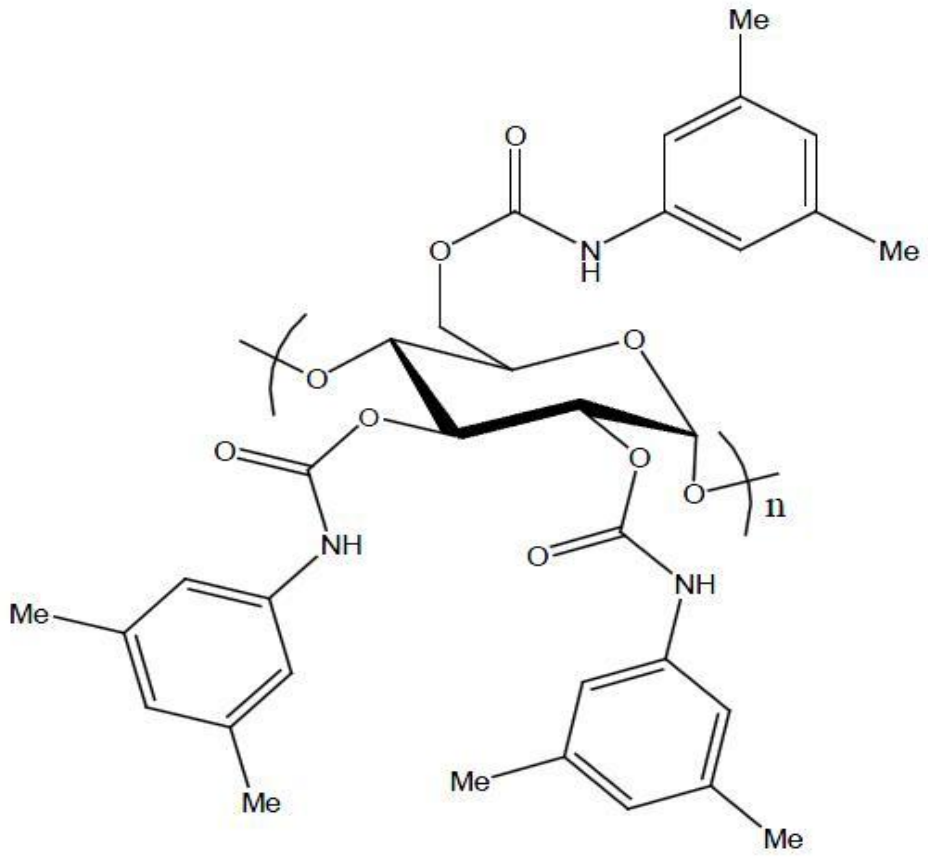


Figura 3.3 – Estrutura química da fase estacionária quiral tris-(3-5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Dentre as FEQs baseadas em tris-fenilcarbamatos as fases tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose são as mais utilizadas, devido à elevada estabilidade 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. Interações π- π também são importantes na resolução quiral de racematos aromáticos. A capacidade de enantiosseparação nos derivados tris-fenilcarbamatos é grandemente influenciada pela posição e natureza dos substituintes nos grupos fenila. Além disso, as FEQs de derivados de polissacarídeos podem ser utilizadas nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico (LOURENÇO et al., 2010).

3.1.4. Fase móvel

Os solventes utilizados para a composição da fase móvel e preparo das amostras foram: 2-propanol 100% (Tedia, EUA) e acetonitrila 99,5% (J.T.Backer, EUA), ambos de grau cromatográfico.

3.1.5. Aparelhagem experimental

3.1.5.1. Cromatógrafo líquido

Os experimentos foram realizados num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3.4), constituído por uma bomba da marca Shimadzu Corporation®/ Modelo LC-20 AT (Japão) e por dois detectores: um da Shimadzu Corporation®/ Modelo SPD- 20A (Japão) com detecção UV-Vis e outro da Jasco®/ Modelo CD-2095 Plus (Japão), com detecção UV-Vis acoplado em série a um dicroísmo circular. Os equipamentos foram integrados a um sistema de aquisição de dados utilizando o software LCsolution® para a obtenção dos picos cromatográficos e quantificação dos enantiômeros do secnidazol.

A temperatura da coluna cromatográfica foi controlada com o auxílio de um banho termostatizado da marca Solab®/ Modelo SL 152 (Basil) e as amostras foram injetadas manualmente com o auxílio de uma seringa de vidro de 250 µL Modelo Microliter™ 725 (Hamilton Co., EUA). Experimentos de varreduras foram realizados em espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo Electron Corporation®/ Modelo Genesys 6 (USA). O secnidazol foi pesado em balança analítica da marca Mettler®/ Modelo AJ150 (Suíça).

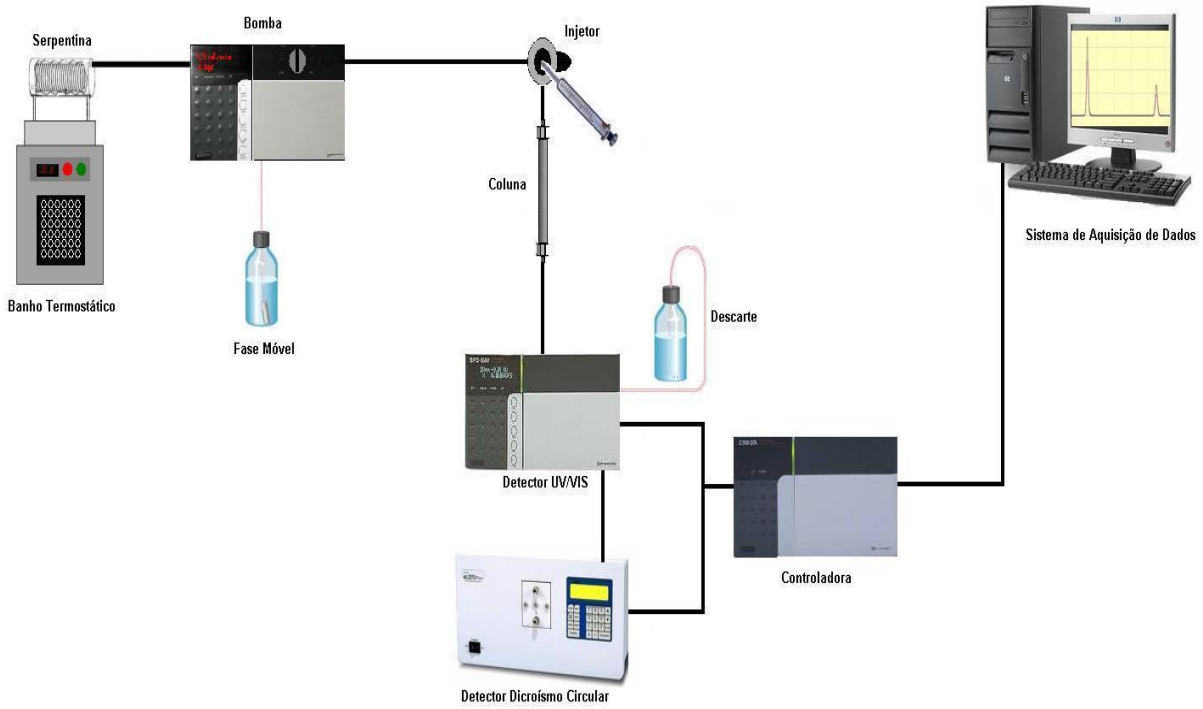


Figura 3.4- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.1.5.2. Unidade leito móvel simulado

A unidade de Leito Móvel Simulado (Figura 3.5), utilizada utilizada neste trabalho, foi adquirida da NovaSep® (Pompey, França). A unidade tem a capacidade de processar 1 a 50 gramas de mistura racêmica por dia, dependendo da concentração de alimentação, tamanho e número de colunas utilizadas. O sistema, empregado no presente trabalho, é constituído por quatro colunas semi-preparativas Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm) de aço inoxidável conectadas em série, totalizando uma massa de 6,0 gramas de fase estacionária quiral.

Para a determinação da concentração total dos enantiômeros do secnidazol nas correntes de extrato e refinado, o sistema contém um detector UV-VIS Modelo Smartline UV-detector-2500 da KNAUER® (Alemanha) equipado com lâmpadas de deutério e halogênio. Já para a detecção da diferença de concentração dos enantiômeros do fármaco, o sistema apresenta um detector de polarímetro Modelo GMBH IBZ da MESSTECHNIK® (Alemanha), dotado de lâmpadas de tungstênio e halogênio.

Além destes constituintes, a unidade LMS também apresenta um conjunto de cinco bombas Microlicopump da Armen Instrument® (França) para as correntes de extrato, refinado, alimentação, reciclo e eluente; um conjunto de válvulas de controle pneumáticas, controladas por ar comprimido; e uma válvula de amostragem conectada em uma das colunas em série, o qual permite coletar amostras para a determinação experimental do perfil de concentração interno dos enantiômeros do secnidazol. Este perfil reflete a dinâmica da separação no interior das colunas cromatográficas.

A unidade contém um sistema de controle, gerenciada pelo software Proficy HMI/SCADA-iFIX® da GE FANUC Automation®, presente em um microcomputador Siemens AG Intel Core 2 2.40 GHz, o qual é projetado para monitorar a purificação de acordo com as regras de qualidade e segurança máximas.

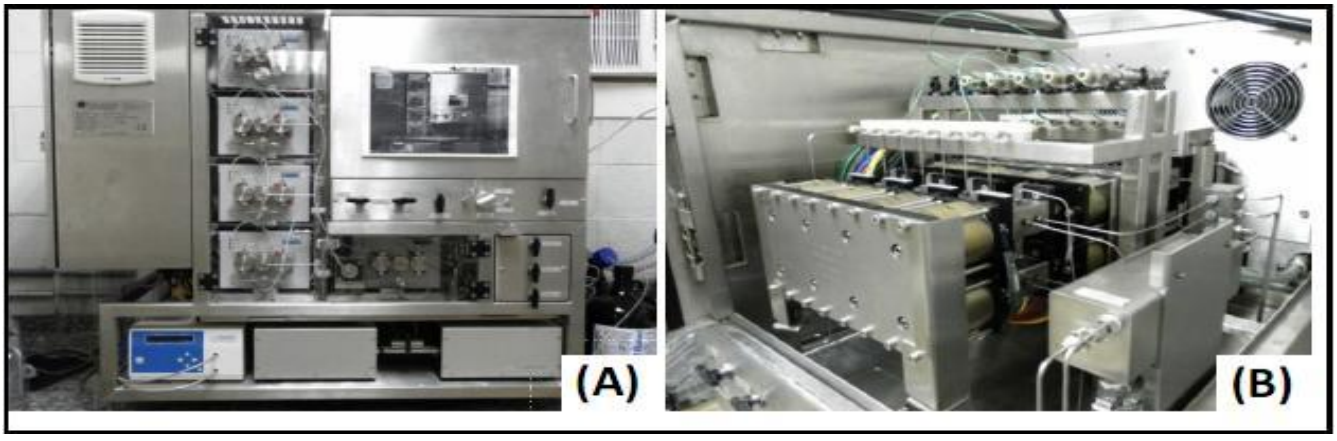


Figura 3.5- Unidade Leito Móvel Simulado: (A) visão externa; (B) visão interna.

3.2. Métodos

A Figura 3.6 mostra o diagrama esquemático da sequência de experimentos realizados em uma única coluna. Esses experimentos foram divididos em duas etapas: a primeira etapa corresponde aos experimentos com soluções diluídas, enquanto que a segunda corresponde aos experimentos com soluções concentradas.

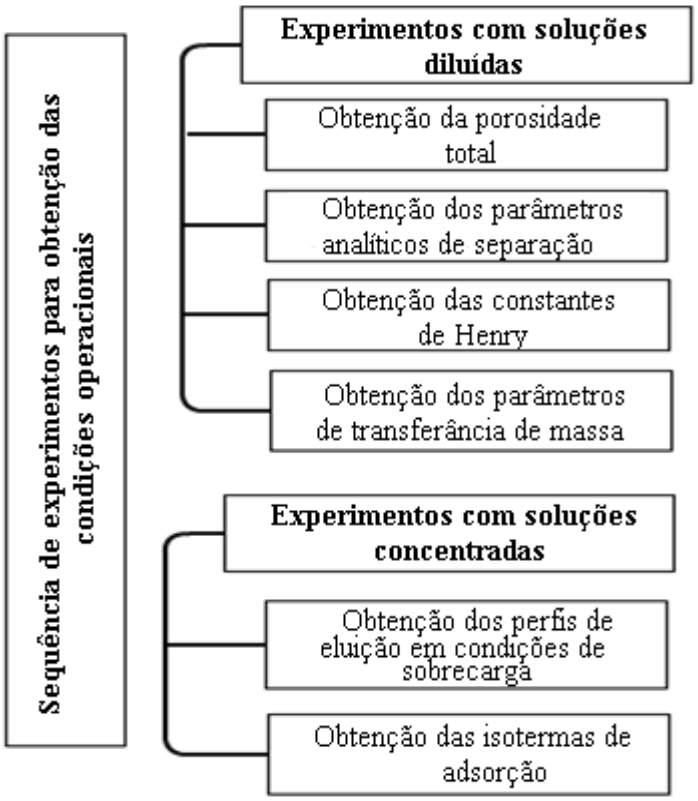


Figura 3.6- Sequência de experimentos em uma única coluna para obtenção das condições operacionais. Adaptado de SIVA JR (2006).

3.2.1. Desenvolvimento da separação cromatográfica

O desenvolvimento da separação dos enantiômeros do secnidazol foi iniciado com experimentos em uma coluna anlítica Chiralpak® AD de 250 x 4,6 mm com diâmetro médio de 10 µm, contendo fase estacionária de polissacarídeo baseada em amilose. Injeções de uma solução da mistura racêmica de secnidazol foram realizadas no sistema cromatográfico para avaliar a melhor condição cromatográfica de separação entre os enantiômeros de secnidazol. No desenvolvimento da metodologia, foram avaliadas as proporções entre os constituintes da fase móvel, volume de injeção, vazão da fase móvel e temperatura de análise da coluna.

3.2.1.1. Definição e *screening* da fase móvel

Na cromatografia líquida de alta eficiência a fase móvel desempenha um papel muito importante, exercendo um papel fundamental no processo de separação. Segundo COLLINS et al. (2006), três critérios devem ser considerados na seleção da fase móvel: (i) características físico-químicas, (ii) força cromatográfica e (iii) seletividade. As colunas baseadas em polissacarídeos apresentam uma limitação específica em relação ao uso de alguns solventes orgânicos podendo, portanto, serem utilizados os seguintes: alcanos (hexano e heptano), alcoóis (isopropanol, metanol e etanol) e acetonitrila.

Os experimentos para a definição da fase móvel foram realizados com as seguintes fases móveis, avaliadas individualmente: hexano/ isopropanol/ dietilamina na proporção de 90:10:0,1% (v/v/v), acetonitrila, isopropanol/ acetonitrila nas seguintes proporções 90:10; 80:20; 60:40; 40:60% (v/v).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata através de injeções de 20 µL da amostra, a uma concentração de 0,2 mg/mL com vazão de 1,0 mL/min, temperatura ambiente e comprimento de onda de 280 nm para cada fase móvel preparada. Analisando as proporções de misturas determinou-se a razão volumétrica de 60:40% de isopropanol/acetonitrila como sendo a que apresentou melhor separação e a que foi mantida para realização dos experimentos.

3.2.1.2. Análise de resposta do sistema de detecção

Para verificar a faixa de comprimento de onda na qual se devem conduzir os experimentos, realizou-se uma varredura em espectrofotômetro na região do UV-Vis. O equipamento foi calibrado com a solução contendo apenas a fase móvel isopropanol/ acetonirila (60/40%, v/v). Posteriormente, foi preparada uma amostra, em fase móvel, contendo a mistura racêmica de secnidazol nas concentrações de 4 mg/L e 2 mg/L. Então foi realizada a varredura entre 190 e 400 nm, obtendo-se, finalmente, o espectro de absorção para o secnidazol para diferentes comprimentos de onda.

3.2.1.3. Ordem de eluição dos constituintes da mistura racêmica

A ordem de eluição dos enantiômeros foi definida através da injeção de 20 µL de uma solução de secnidazol na forma racêmica em concentrações de 2,0 mg/mL e 0,4 mg/mL, vazão de eluição 1,0 mL/min de fase móvel composta por isopropanol/acetonitrila (60/40%, v/v) e temperatura de 25°C. A ordem de eluição foi avaliada através de um sistema de detecção baseado em dicroísmo circular (CD) e UV-Vis., com o comprimento de onda previamente ajustado em 365 nm. Na aplicação do dicroísmo circular, cada enantiômero dará uma resposta caracaterística, sendo esta com sinal positivo ou negativo.

3.2.2. Experimentos com soluções diluídas

3.2.2.1. Determinação da porosidade total

A caracterização da coluna cromatográfica foi obtida através da realização de experimentos de injeções no sistema cromatográfico do composto 1,3,5-tri-terc-butil benzeno (TTBB). Estes experimentos foram realizados com o intuito de verificar a homogeneidade do recheio e determinar a porosidade total da coluna (ε_T). O TTBB é uma molécula relativamente pequena e não é retida pela fase estacionária, sendo capaz, portanto, de se difundir não somente através do leito, mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso.

O TTBB foi dissolvido na própria fase móvel, constituída de uma mistura contendo isopropanol/acetonitrila (60:40 v/v) e soluções com concentração de 0,7 mg/mL foram preparadas. Pequenos pulsos cromatográficos (20 µL) destas soluções foram injetdas na coluna sob condições isocráticas, após um período de tempo necessário para a estabilização do sistema, a diferentes vazões da fase móvel (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL/min). A temperatura do sistema foi mantida constante e igual à 20°C. As respostas dos pulsos foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda a 280 nm.

O valor da porosidade total é determinado a partir da análise do primeiro momento do composto não retido. Os primeiros momentos foram obtidos pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos experimentais, de acordo com a Equação 2.1. Portanto, como o composto TTBB é inerte, logo o termo relativo à adsorção na Equação 2.3 foi desprezado e a porosidade

total foi obtida pela inclinação da reta entre o primeiro momento e o inverso da velocidade superficial do fluido, como apresentado pela Equação 2.7.

$$\mu = \frac{L}{u}\left[1+\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\varepsilon_p\right]+\frac{t_M}{2} = \frac{L}{u}\varepsilon_T + \frac{t_M}{2} \qquad \textbf{(2.7)}$$

3.2.2.2. Determinação dos parâmetros cromatográficos

O estudo da separação cromatográfica do secnidazol racêmico foi realizado com injeções da solução de secnidazol racêmico a 0,3 mg/mL na fase móvel. Volumes de 20 µL foram injetados no sistema CLAE com coluna preparativa Chripalpak® AD de 100 x 10 mm, sob condições isocráticas, à vazão de fase móvel de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL/min. As temperaturas avaliadas foram de 20, 25, 30 e 35°C. As respostas das injeções foram monitoradas no detector de UV a 320 nm e os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Com os valores de tempos de retenção obtidos para os enantiômeros, foi possível determinar os parâmetros comatográficos de fator de retenção (k_i), fator de separação (α), resolução (Rs) e número de pratos teóricos (N_p) que foram determinados a partir das Equações 2.8 a 2.11, respectivamente. O TTBB, como não interage com a fase estacionária, foi utilizado para a obtenção dos tempos de retenção t_M, indispensável para cálculos dos parâmetros cromatográficos, nas diferentes vazões e temperaturas estudadas.

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_M}{t_M} \qquad \textbf{(2.8)}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \qquad \textbf{(2.9)}$$

$$Rs = 1{,}177\ \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \qquad \textbf{(2.10)}$$

$$N = 5{,}545\left(\frac{(t_R - t_M)}{w_h}\right)^2 \qquad \textbf{(2.11)}$$

3.2.2.3. Determinação das constantes de Henry

Para a determinação das constantes de equilíbrio de adsorção (K) e de Henry (He), serão utilizados valores de tempo de retenção dos enantiômeros obtidos dos experimentos voltados à obtenção de parâmetros cromatográficos.

As constantes de equilíbrio de adsorção podem ser determinadas utilizando um método similar ao descrito para a obtenção das porosidades, ou seja, aplicando-se o método dos momentos. Logos os valores de K, para diferentes temperaturas, são determinados indiretamente (Equação 3.1) através do coeficiente angular (η) da reta obtida do gráfico do primeiro momento (μ_1) quando são plotados os valores de tempos de retenção dos respectivos enantiômeros, na ordenada, em função da relação (L/u), na abscissa.

$$\eta = 1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} K \qquad \textbf{(3.1)}$$

As constantes de Henry podem ser determinadas através de duas maneiras. Uma forma é através da Equação 3.2, obtendo-se as constantes para vazões e temperaturas distintas. Neste caso, os cálculos são efetuados levando-se em consideração os dados experimentais dos tempos de retenção dos enantiômeros obtidos na determinação dos parâmetros cromatográficos e o valor da porosidade total, obtida experimentalmente com TTBB, através do método do primeiro momento.

$$He_i = \frac{(t_{R,i} - t_M)}{t_M} \frac{\varepsilon_T}{(1-\varepsilon_T)} \qquad \textbf{(3.2)}$$

Outra forma de se obter as constantes de Henry, em diferentes temperaturas, é através dos valores das constantes de equilíbrio de adsorção K e da porosidade das partículas, em que se aplica a Equação 3.3.

$$K_i = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p) He_i \qquad \textbf{(3.3)}$$

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

Os coeficientes de dispersão axial (D_L) e os parâmetros de transferência de massa global (k_m) serão determinados a partir da solução racêmica de secnidazol em diferentes temperaturas e vazões de fase móvel.

Tomando-se dados experimentais obtidos, são calculados o número de pratos teóricos (N_p) e os valores de altura equivalente a um prato (*HETP*) através das Equações 2.11 e 2.13, respectivamente. Então, são construídos gráficos de *HETP* em funçao de u (velocidade superficial) para ambos os enantiômeros em diferentes temperaturas e são realizados ajustes dos dados tendo como base a equação de van Deemter (Equação 2.12).

A partir dos ajustes, são determinados os valores dos coeficientes A, B e C da curva de van Deemter, podendo-se, finalmente calcular os valores de D_L e k_m recorrendo-se às Equações 2.17 e 2.18, respectivamente.

Vale ressaltar que o coeficiente B da equação de van Deemter é dado pela expressão:

$$B = 2\gamma_1 D_m \qquad \textbf{(3.4)}$$

cujos parâmetros (γ_1 e D_m) já foram definidos anteriormente.

3.2.2.5. Análise termodinâmica de adsorção

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção serão determinados e avaliados a partir dos dados experimentais obtidos na determinação dos parâmetros cromatográficos para as temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C, levando-se em consideração os fatores de retenção (k_i) e sepração (α).

As variações de entalpia (ΔH_i^0) e entropia (ΔS_i^0) são determinados pela Equação 2.24 através de gráficos lineares de $\ln k$ em função do inverso da temperatura, cuja inclinação e

intersecção da reta possibilitam obter os termos entálpico e entrópico, respectivamente. O mesmo procedimento pode ser utilizado para determinar os parâmetros referentes às diferenças de entalpia ($\Delta(\Delta H^0)$) e entropia ($\Delta(\Delta S^0)$), recorrendo-se a Equação 2.25. A temperatura de enantiossletividade pode ser obtida através da Equação 2.26.

3.2.3. Experimentos com soluções concentradas

3.2.3.1. Estudo de sobrecarga da coluna

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

O estudo neste trabalho foi obtido pela realização do método de sobrecarga de volume, onde a concentração da amostra de 10 mg/mL foi mantida constante variando o volume de injeção: 20; 50; 100; 200; 500; 600 e 800µL. Os experimentos foram realizados a uma vazão de 1,0 mL/min e temperatura controlada de 20°C. As respostas foram monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda em 400 nm. A avaliação das condições de sobrecarga foi estudada através dos parâmetros cromatográficos do fator de retenção e fator de separação, determinados a partir das Equações 2.8 e 2.9, respectivamente.

3.2.3.2. Determinação das isotermas de adsorção pelo método de análise frontal

As isotermas de adsorção dos enantiômeros do secnidazol foram determinadas a partir das curvas de ruptura obtidas com soluções da mistura racêmica de concentrações iguais a 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 e 7,50 mg/mL. As condições cromatográficas utilizadas nos experimentos, como o comprimento de onda, temperatura e vazão da fase móvel, foram 398 nm, 25 ºC e 2,00 mL/min, respectivamente. A princípio, a coluna foi equilibrada com a fase móvel sendo alimentada por uma das bombas do sistema de CLAE e o estado de equilíbrio foi observado quando a resposta do

sistema de detecção se manteve invariável. Neste momento programou-se uma repentina troca na alimentação do sistema, de forma que, a segunda bomba substituísse a alimentação da fase móvel pela solução de concentração conhecida de secnidazol. Um volume contínuo foi alimentado até a saturação da coluna (34 mL), situação na qual a concentração na saída foi a mesma da alimentação (etapa de adsorção). Houve então mudança para a bomba inicial de alimentação de fase móvel e assim se manteve o experimento até a completa remoção do secnidazol da coluna (etapa de dessorção). Este procedimento foi seguido para as diferentes concentrações e a análise da resposta do sistema de detecção possibilitou o cálculo dos pontos da isoterma competitiva. Curvas analíticas possibilitaram a determinação das concentrações a partir da resposta do detector. Os dados experimentais de equilíbrio foram obtidos da frente de adsorção de cada curva de ruptura de acordo com a Equação 2.21.

3.2.3.3. Obtenção dos parâmetros para separação em leito móvel simulado

Para a aplicação do método *shortcut* são necessários os dados de pulsos longos em três vazões distintas, utilizando quatro colunas acopladas em série. O método para obtenção dos pulsos longos é idêntico ao método de obtenção das isotermas de adsorção. As curvas de ruptura foram obtidas com soluções da mistura racêmica de concentrações de 2,50 mg/mL nas vazões de 2,00; 2,50 e 3,00 mL/min. Durante a obtenção das curvas de ruptura foram coletadas amostras a cada minuto para obtenção das concentrações dos enantiômeros. A partir dos gráficos das concentrações dos enantiômeros foram obtidos os tempos dos pontos de inflexão e a 5% do platô de concentração, os quais forneceram os dados das velocidades de onda de choque (u_{sh}), de onda de difusão (u_D) e do comprimento das zonas de transferência de massa (L_{ztm}). Com esses dados aplicados nas Equações 2.23 à 2.28 foram obtidas as vazões do extrato, refinado, eluente, reciclo bem como o tempo de troca.

.

Capítulo 4

4. Resultados e Discussões

Neste capítulo serão apresentadas os resultados obtidos na determinação dos parâmetros de projeto para separação dos enantiômeros do secnidazol.

4.1. Experimentos para desenvolvimento do método de separação cromatográfico

4.1.1. Avaliação da resposta do sistema de detecção

O desenvolvimento do método de separação foi iniciado com a realização de uma varredura no espectro ultra-violeta, de uma solução da mistura racêmica de secnidazol, para verificação do comprimento de onda de máxima absorção. O valor de 320 nm foi encontrado como máximo de absorção para o secnidazol (Figura 4.1). Para o monitoramento das injeções cromatográficas foram utilizados os seguintes comprimentos de onda: (i) 320 nm- que é o valor máximo de absorção para o secnidazol- e (ii) 280nm – que é o comprimento de onda onde se pode visualizar o composto inerte TTBB.

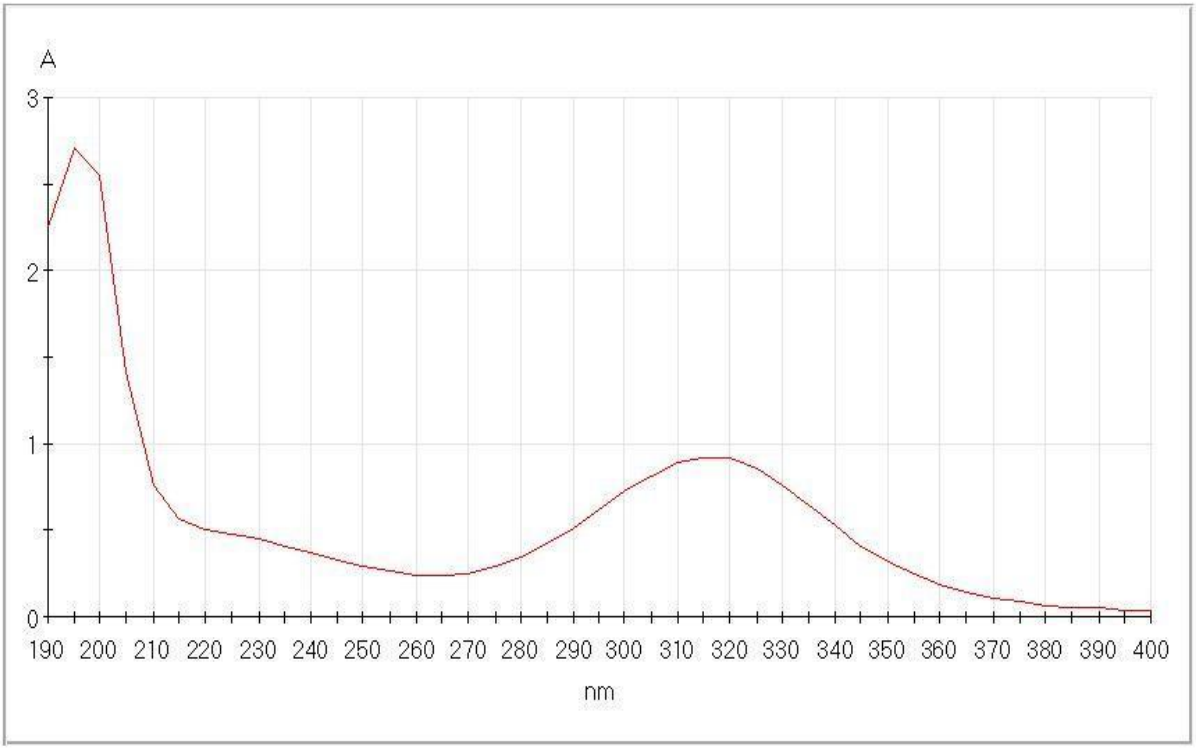


Figura 4.1 – Espectro da solução de secnidazol racêmico. Concentração da solução de 2,0 mg/L na fase móvel (isopropanol:acetonitrila, 60:40% v/v) a 25°C.

4.1.2. Seleção da fase estacionária

A fase estacionária quiral tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi selecionada para ser a FEQ utilizada neste estudo, com base nos estudos realizados por ALI et al.,2009. Nestes estudos foram reportados a separação de quatro compostos imidazóis (econazol, miconazol, isoconazol e sulconazol) em fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, conhecida comercialmente como Amycoat^{TM} (150 x 4,6 mm, 3,0 µm de diâmetro da partícula) em fase reversa utilizando como fase móvel diferentes combinações de água e acetonitrila. ALI et al. (2009) também demonstraram as ligações que ocorrem entre os compostos imidazólicos e a fase estacionária. A Figura 4.2 apresenta as ligações entre o composto secnidazol e a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

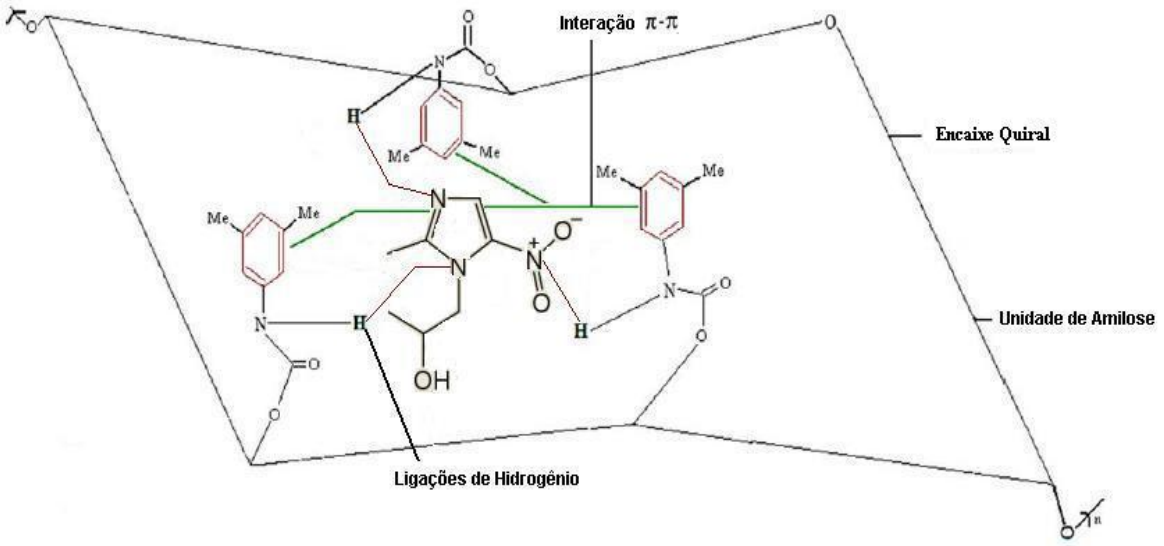


Figura 4.2 – Representação das ligações supra-moleculares do secnidazol nas ranhuras quirais da fase estacionária tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Adaptado de ALI et al., 2009.

4.1.3. Seleção e *screening* da fase móvel

Para a definição da fase móvel foram selecionados os solventes acetonitrila e isopropanol, a fim de se trabalhar no método polar orgânico conforme relatado por SUTEU, 2005. Esse método foi escolhido para tentar reproduzir os estudos de ALI et al. (2009) que utilizaram acetonitrila e água. Todos os ensaios preliminares para seleção e *screening* da fase móvel foram realizados utilizando coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 46 mm, 10 µm).

Os primeiros experimentos foram realizados com 100% de acetonitrila, no entanto, não houve separação dos enantiômeros conforme apresentado na Figura 4.3.

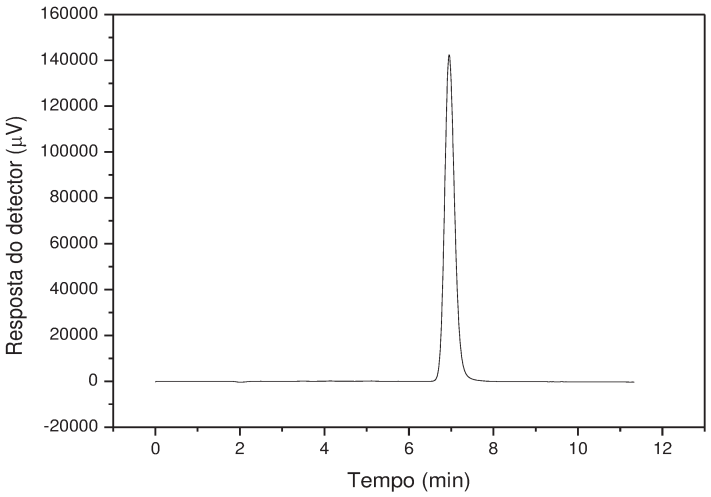


Figura 4.3 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 100% ACN. $C_{mistura}$= 0,5 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temp.= 25°C (ambiente); Vol. inj. = 20 μL e λ = 280 nm.

Foram testadas combinações de acetonitrila e isopropanol a fim de se obter a completa separação dos enantiômeros do secnidazol onde foi possível obter uma boa separação dos enantiômeros a partir de 60% de acetonitrila e 40% de isopropanol.

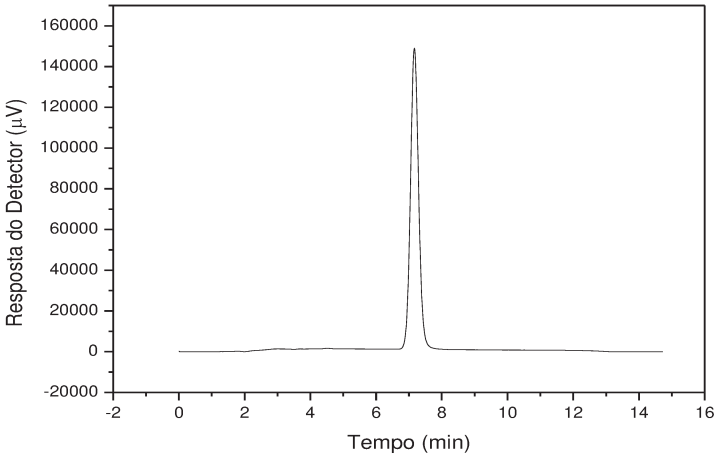


Figura 4.4 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 90% ACN e 10% IPA. $C_{mistura}$= 0,5 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temp.= 25°C (ambiente); Vol. inj. = 20 μL e λ = 280 nm.

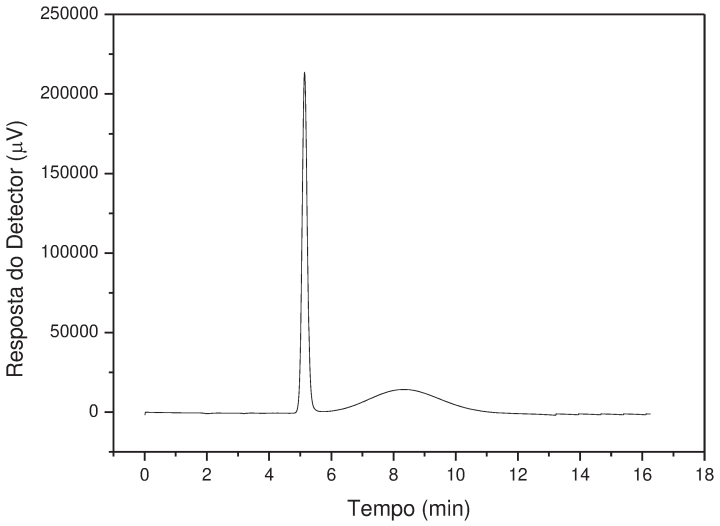


Figura 4.5 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 80% ACN e 20% IPA. $C_{mistura}$= 0,5 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temp.= 25°C (ambiente); Vol. inj. = 20 μL e λ = 280 nm.

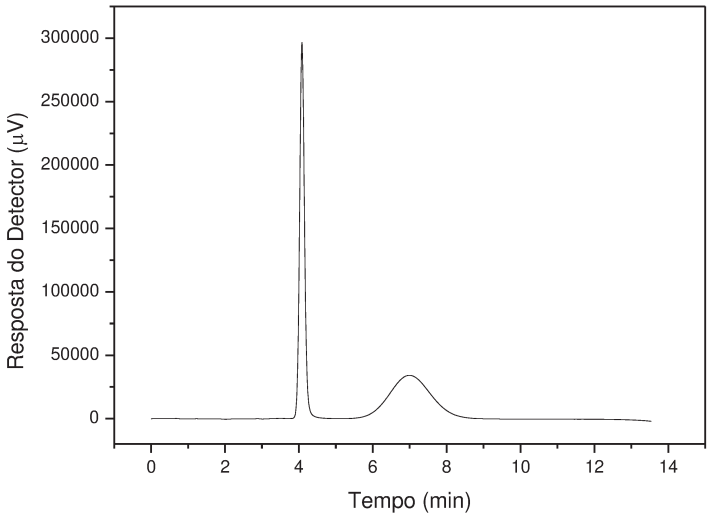


Figura 4.6 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% ACN e 40% IPA. $C_{mistura}$= 0,5 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temp.= 25°C (ambiente); Vol. inj. = 20 μL e λ = 280 nm.

Apesar de alcançar uma condição de fase móvel satisfatória para os experimentos de separação dos enantiômeros, o objetivo de otimizá-la inclui a questão da diferença nos tempos de retenção entre os mesmos, pois, o enantiômero mais retido (t_R=6,527 min) está sendo eluído muito próximo do enantiômero menos retido (t_R=4,106 min). Para tanto, com a intenção de aumentar a diferença nos tempos de retenção dos enantiômeros, foram realizados experimentos invertendo a proporção dos solventes. A Figura 4.7 mostra uma redução no tempo de retenção do enantiômero menos retido, além de um tempo maior de eluição entre os enantiômeros. Os picos do perfil de eluição separaram-se por linha de base. O enantiômero menos retido apresentou tempo de retenção de 3,812 min, enquanto o mais retido 8,700 min. De acordo com este resultado, esta proporção de fase móvel foi utilizada na realização dos demais experimentos.

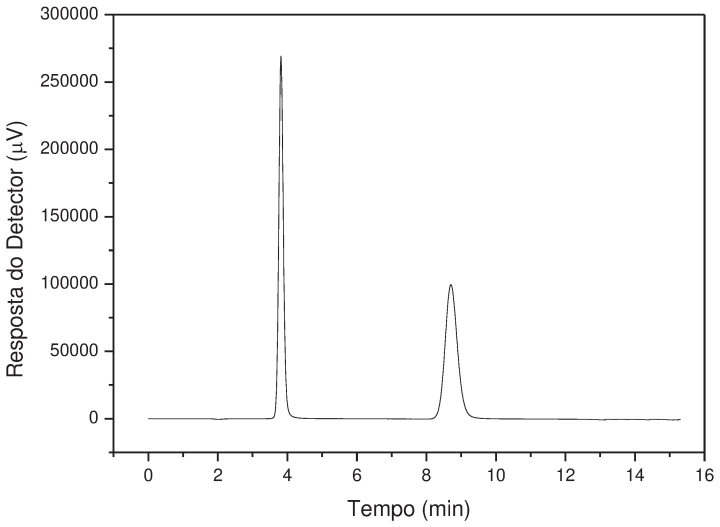


Figura 4.7 – Cromatograma do secnidazol racêmico em fase móvel 60% IPA e 40% ACN. $C_{mistura}$= 0,5 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temp.= 25°C (ambiente); Vol. inj. = 20 μL e λ = 280 nm.

4.2. Ordem de Eluição

A determinação da ordem de eluição foi realizada num detector de dicroísmo circular (CD) em série com um detector UV-VIS. Nesta condição foi possível detectar os dois sinais dos picos formados pelo CD e UV-VIS. Verificou-se que o primeiro e o segundo pico correspondem aos enantiômeros (-)-secnidazol e (+)-secnidazol, respectivamente. Através das análises da

configuração absoluta reportadas por TIAN et al. (2003) podemos afirmar que se tratam do R-(-)-secnidazol e S-(+)-secnidazol.

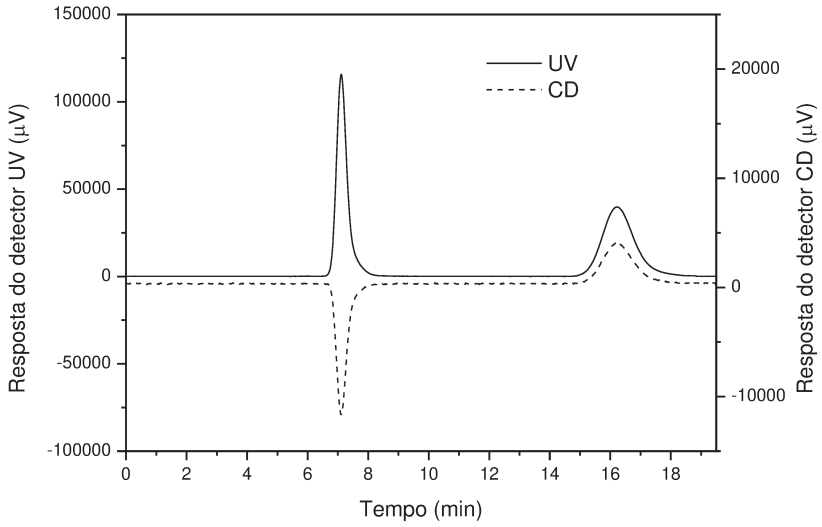


Figura 4.8- Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol, na fase móvel isopropanol:acetonitrila (60:40, v/v). $C_{mistura}$= 2,0 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temperatura= 22°C (ambiente); Vol. injeção = 20 μL e Comprimento de onda (λ) = 365 nm.

4.3. Experimentos com soluções diluídas

4.3.1. Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação

A partir da separação dos enantiômeros do secnidazol na coluna analítica foi iniciado o desenvolvimento da separação na coluna semi-preparativa Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 μm). Os parâmetros cromatográficos foram determinados a partir de injeções de solução do secnidazol racêmico para a faixa de temperatura e vazão da fase móvel estudados. Foram determinados os fatores de retenção, fatores de separação, resolução e número de pratos.

As Tabelas 4.1 a 4.4 apresentam os valores dos parâmetros cromatográficos para a mistura racêmica do secnidazol a diferentes vazões de fase móvel e temperatura. Os fatores de retenção e

de separação e a resolução foram calculados a partir das Equações 2.8, 2.9 e 2.10, respectivamente.

Tabela 4.1 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 1,0 mL/min.

Temperatura (°C)	$\mathbf{k_{R\text{-}sec}}$	$\mathbf{k_{S\text{-}sec}}$	**α**	$\mathbf{R_S}$
20	0,2522±0,00043	1,7631±0,00294	6,9905±0,00617	6,686±0,02287
25	0,2355±0,00225	1,6785±0,00230	7,1301±0,07216	6,887±0,02699
30	0,2163±0,00239	1,6056±0,00312	7,4227±0,0683	7,059±0,00821
35	0,2039±0,00201	1,5602±0,01259	7,6515±0,09973	7,227±0,03279

Tabela 4.2 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 1,5 mL/min.

Temperatura (°C)	$\mathbf{k_{R\text{-}sec}}$	$\mathbf{k_{S\text{-}sec}}$	**α**	$\mathbf{R_S}$
20	0,2500±0,00281	1,7509±0,00165	7,0029±0,07272	5,761±0,03050
25	0,2332±0,00179	1,6731±0,00346	7,1746±0,04127	5,975±0,01201
30	0,2163±0,00286	1,6007±0,00574	7,4005±0,07141	6,138±0,01534
35	0,2036±0,00226	1,5562±0,01018	7,6459±0,11047	6,308±0,02452

Tabela 4.3 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 2,0 mL/min.

Temperatura (°C)	$\mathbf{k_{R\text{-}sec}}$	$\mathbf{k_{S\text{-}sec}}$	**α**	$\mathbf{R_S}$
20	0,24948±0,00402	1,7422±0,00744	6,9870±0,08388	5,142±0,02352
25	0,2323±0,00288	1,6636±0,00569	7,1601±0,06409	5,347±0,00893
30	0,2148±0,00316	1,5930±0,00489	7,4158±0,08689	5,502±0,01179
35	0,2025±0,00233	1,5480±0,01198	7,6453±0,09659	5,672±0,02119

Tabela 4.4 – Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros do secnidazol para cada temperatura estudada na vazão de 2,5 mL/min.

Temperatura (°C)	$k_{R\text{-}sec}$	$k_{S\text{-}sec}$	α	R_S
20	0,2483±0,00326	1,7334±0,00424	6,9819±0,07852	4,696±0,01932
25	0,2314±0,00208	1,6541±0,00426	7,1494±0,04584	4,891±0,00521
30	0,2138±0,00217	1,5852±0,00124	7,4142±0,06943	5,038±0,01234
35	0,2010±0,00249	1,5410±0,00904	7,6683±0,10873	5,192±0,01596

Nota-se a melhora da separação com a elevação da temperatura. Os valores de coeficiente de separação variaram pouco com a alteração da vazão para uma mesma temperatura, fato que já era esperado. A resolução entre os enantiômeros do secnidazol diminui com o aumento da vazão da fase móvel e aumenta com a elevação da temperatura. Com o aumento da temperatura de análise ocorre redução do tempo de retenção. A temperatura aumenta a velocidade de interação do composto com a fase estacionária, reduz a viscosidade da fase móvel e, portanto reduz o tempo de retenção e, proporcionalmente, o fator de retenção.

Tomando-se como exemplo os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos a 20°C (Tabela 4.1), pode ser observado que os fatores de retenção (k_i) para os enantiômeros do secnidazol apresentaram valores médios de 0,2255 e 1,7631, respectivamente. Os fatores de retenção do enantiômero mais retido (S-(+)-secnidazol) obtidos para as diferentes vazões de fase móvel e temperaturas se enquadram dentro da faixa de valores considerada ideal para a separação de enantiômeros. Segundo COLLINS et al., (2006), esta faixa está compreendida entre 1 a 10. Já os fatores de retenção do enantiômero menos retido (R-(-)-secnidazol) apresentam valores menores devido ao tempo de retenção muito próximo ao tempo de retenção do composto inerte TTBB.

Com relação a seletividade ou fator de separação (α), este apresentou valor próximo a 6,99, o que segundo OKAMOTO e IKAI (2008), retrata uma completa separação dos enantiômeros em colunas quirais baseadas em polissacarídeos, visto que o valor mínimo exigido

é de 1,20. No presente trabalho, portanto, foram alcançados valores de fator de separação superiores ao estabelecido.

Pode-se observar que a resolução (R_s) diminuiu com o aumento da vazão de fase móvel e apresentou valores entre 4,696 e 7,227. Segundo COLLINS et al. (2006), quando R_s=1, as duas bandas são razoavelmente separados com somente 2% de superposição. Maiores valores de resolução indicam melhor separação: R_s=1,25 é suficiente para fins quantitativos e R_s>1,5 indica separação completa. Além disso, R_s apresentou um valor máximo a 35 ºC em todas as vazões. ZHAO e PRITTS (2007) atribuíram tal comportamento a diferente influência da temperatura sobre os tipos de interações existentes entre os enantiômeros e a FEQ.

Observa-se na Figura 4.9 que, para a menor vazão estudada (1,00 mL/min) em diferentes temperaturas, os valores de resolução estão próximos, com maior valor a 35 °C. No entanto, como o ganho de resolução foi baixo, quando se aumentou em 15°C a variação de temperatura do sistema, preferiu-se conduzir o processo de separação a 20°C, em que se obteve valor médio de 5,57.

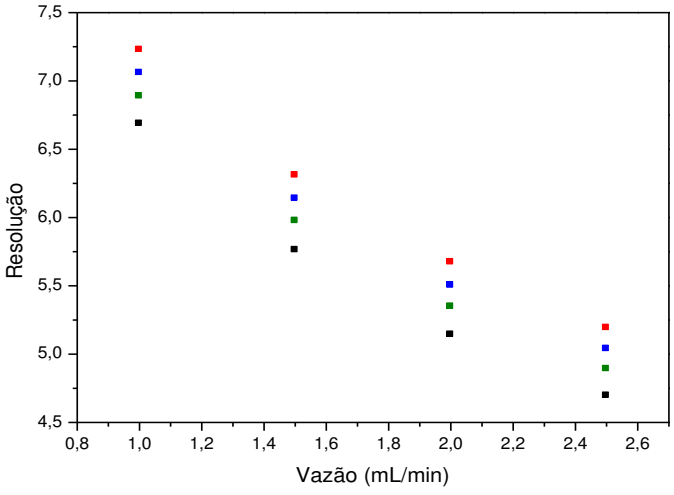


Figura 4.9- Variação da resolução com a vazão: (■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C. $C_{mistura}$= 0,30 mg/mL; V. injeção = 20 µL, FM= 60% IPA: 40% ACN e λ = 320 nm.

A Figura 4.10 apresenta o gráfico da variação da resolução com a temperatura. Com o aumento da temperatura há um aumento nos valores de resolução.

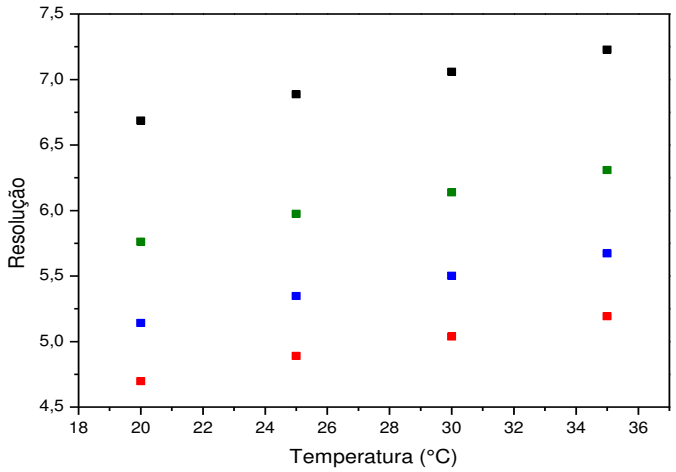


Figura 4.10- Variação da resolução com a temperatura: (■)1,0 mL/min; (■)1,5 mL/min; (■)2,0 mL/min; e (■)2,5 mL/min.$C_{mistura}$= 0,30 mg/mL; V. injeção = 20 µL, FM= 60% IPA: 40% ACN e λ = 320 nm.

A temperatura influencia diretamente nas propriedades físicas tanto do material adsorvente quanto dos solventes que compõem a fase móvel. Como a retenção de um componente é governada por um complexo triângulo de interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, a elevação da temperatura acaba refletindo na intensidade de interação dos enantiômeros (SUBRA et al.,1998). Podemos observar que vários parâmetros cromatográficos apresentam melhores resultados a 35°C, porém como os valores obtidos a 20°C estão muito acima dos valores considerados satisfatórios, não se justifica o uso de energia para manter o sistema a maiores temperaturas. Portanto a temperatura estabelecida para realizar as próximas análises foi de 20°C.

4.3.1.1. Cromatogramas

Os cromatogramas para o composto não retido TTBB e mistura racêmica do secnidazol foram determinados a diferentes temperaturas e vazões de fase móvel composta de uma mistura de isopropanol:acetonitrila na proporção de 60:40% v/v.

A Figura 4.11 apresenta o perfil de eluição do composto inerte TTBB. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com vazão de fase móvel de 1,0 mL/min utilizando coluna preparativa Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 μm). Pode ser observado na Figura 4.11 que o tempo de retenção e a largura da base do pico de eluição são relativamente pequenos, indicando a possibilidade de não interação estereosseletiva do TTBB com a fase estacionária quiral.

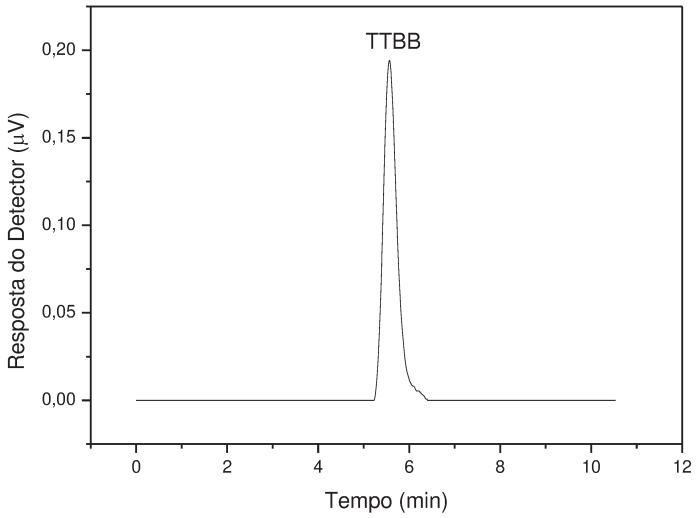


Figura 4.11- Perfil de eluição do composto inerte TTBB. C_{TTBB}= 0,47 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; Temperatura = 20°C, V. injeção = 20 μL, FM= 60% IPA: 40% ACN e λ = 280 nm.

A Figura 4.12 apresenta o cromatograma do secnidazol racêmico para a faixa de temperatura estudada e vazão de fase móvel igual a 1,0 mL/min. As intensidades dos picos de eluição dos enantiômeros do secnidazol são maiores que a do TTBB, demonstrando, as diferenças no processo de eluição entre o composto inerte e os que sofrem interações com a fase estacionária.

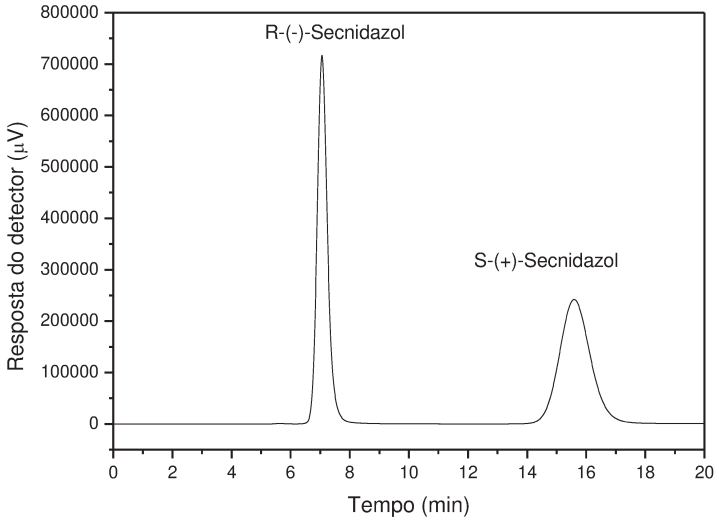


Figura 4.12- Perfil de eluição dos enantiômeros do secnidazol a 20°C. $C_{mistura}$= 0,70 mg/mL; Q= 1,0 mL/min; V. injeção = 20 μL, FM= 60% IPA: 40% ACN e λ = 320 nm.

Através dos perfis de eluição mostrados foi possível observar que a separação entre os enantiômeros do secnidazol ocorre até a linha de base nas condições testadas. Para as demais vazões de fase móvel a separação também ocorre por linha de base. Os resultados de resolução e seletividade, discutidos na seção anterior, comprovam esta separação, pois estão acima do valor desejado para uma possível separação em escala preparativa.

4.3.2. Determinação da porosidade total

A porosidade total foi obtida a partir da Equação 2.7 que considera os valores dos primeiros momentos dos pulsos cromatográficos com o composto inerte TTBB. Os valores obtidos para ε_T, estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resultado da porosidade total a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Porosidade Total ε_T
20	0,6920
25	0,6874
30	0,6809
35	0,6839
Média	**0,6861**

Os valores encontrados para porosidade total variaram pouco com o aumento da temperatura. A Figura 4.13 apresenta a reta obtida pela análise do primeiro momento para a determinação da porosidade total conforme a Equação 2.2, a temperatura de 20°C.

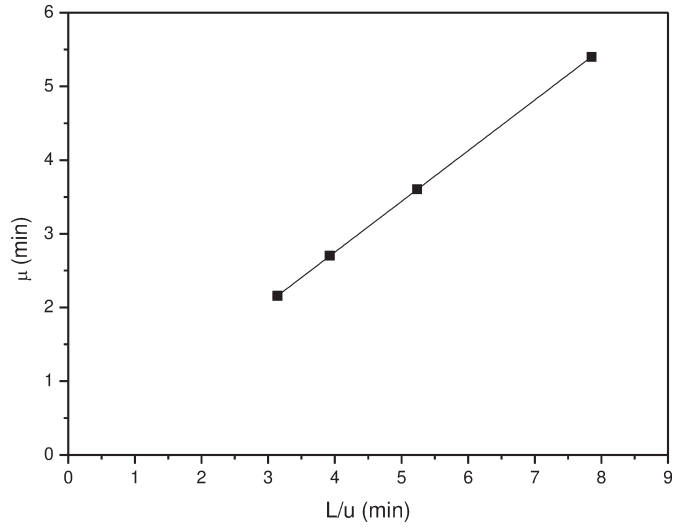


Figura 4.13- Primeiro momento vs inverso da velocidade superficial para o TTBB a 20°C.

4.3.3. Determinação da constante de Henry

Os valores da constante de Henry (He_i), para os enantiômeros do secnidazol, foram calculados a partir dos tempos de retenção dos enantiômeros ($t_{R,i}$), do tempo de retenção do composto não retido (t_M) e da porosidade do leito (ε_T), conforme a Equação 4.1.

$$He_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \qquad \textbf{(4.1)}$$

Os valores encontrados comprovam que o R-(-)-secnidazol possui baixa afinidade pela fase estacionária, uma vez que apresenta valores de *He* 7 vezes menores do que o S-(+)-secnidazol.

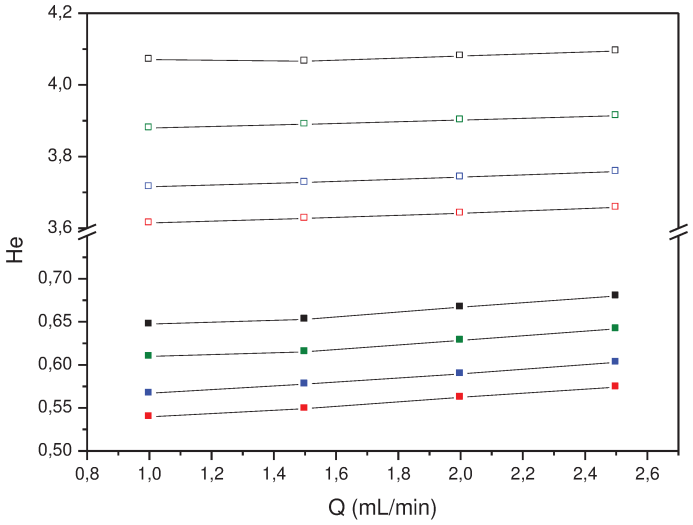


Figura 4.14 – Variação das constantes de Henry para as temperaturas: (■ e □) 20°C; (■ e □) 25°C; (■ e □) 30°C e (■ e □) 35°C. Os símbolos preenchidos se referem ao R-(-)-secnidazol e os vazados ao S-(+)-secnidazol.

As constantes de Henry são parâmetros fundamentais para o projeto das condições operacionais do sistema Leito Móvel Simulado, quando são utilizados métodos baseados na teoria do equilíbrio (Método do Triângulo), conforme MAZZOTI et al. (1997).

4.4.3. Eficiência de separação e coeficientes de transferência de massa

A eficiência da separação da coluna cromatográfica pode ser avaliada a partir de uma análise detalhada da *HETP*, que é determinada a partir do número de pratos (N_P). A Tabela 4.6 expõe os valores de N_{Pi} nas faixas de vazão e temperatura estudadas. Os valores de N_{Pi} alcançados revelam alta eficiência de separação da coluna, destacando os valores superiores a

2300 (R-(-)) e 1300 (S-(+)) para a vazão de 1,00 mL/min e temperatura de 35ºC. Segundo SNYDER e KIRKLAND (1979), geralmente, baixos valores de *HETP* (conseqüentemente altos valores de N_{Pi}) são alcançados em colunas empacotadas com partículas relativamente pequenas sob baixa vazão de fase móvel e altas temperaturas de separação. Na avaliação para uma mesma temperatura, a redução dos valores de $N_{pR-(-)}$ e $N_{pS-(+)}$, com o aumento da vazão, ocorre devido ao maior alargamento do pico e redução do tempo de retenção. Quanto mais largo for o pico cromatográfico e menor o tempo de retenção menor será o número de pratos com menor eficiência de separação. Nota-se ainda que os valores de $N_{pR-(-)}$ e $N_{pS-(+)}$ aumentam com o aumento da temperatura.

Tabela 4.6 –Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas.

Q (mL/min	**T (°C)**	**$Np_{R-(-)}$**	**$Np_{S-(+)}$**	**Q (mL/min**	**T (°C)**	**$Np_{R-(-)}$**	**$Np_{S-(+)}$**
1,00	20	1999	1057	2,00	20	1276	619
	25	2165	1173		25	1408	695
	30	2293	1273		30	1513	761
	35	2399	1366		35	1613	826
1,50	20	1557	779	2,50	20	1084	517
	25	1707	869		25	1203	582
	30	1828	951		30	1297	637
	35	1929	1025		35	1377	690

A partir dos valores apresentados na Tabela 4.6, a Equação 2.15 foi utilizada para o cálculo dos valores de *HETP*. As Figuras 4.15 e 4.16 mostram a dependência da *HETP* com a velocidade superficial de escoamento da fase móvel (u) (gráfico de van Deemter) para os enantiômeros R-(-) e S-(+), respectivamente. Para a faixa de vazão utilizada observou-se relação linear entre *HETP* e u e não foi verificado o ponto de inflexão mínimo para nenhum dos enantiômeros tal como apresentado na Figura 2.21.

Para os valores de temperatura investigados, o enantiômero mais retido, S-(+)-secnidazol apresentou eficiência muito maior em relação ao R-(-)-secnidazol. Podemos observar que para ambos enantiômeros o aumento da temperatura provoca uma diminuição de *HETP* o que aumenta a eficiência da coluna.

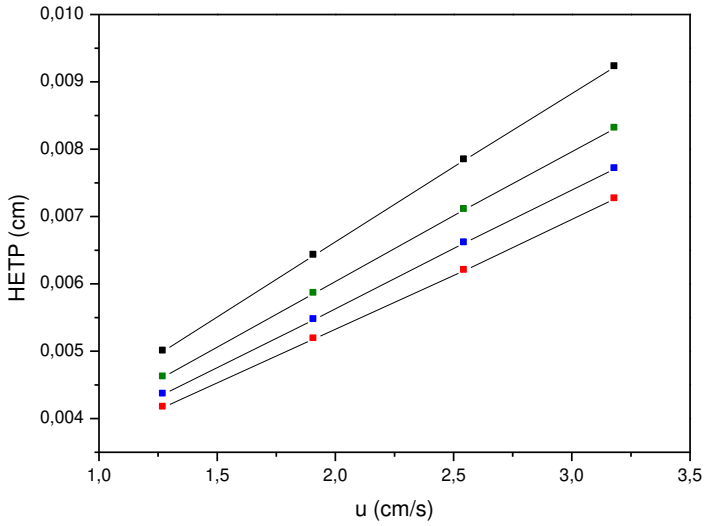


Figura 4.15 -Curva de van Deemter para o R-(-)-sec a:(■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C.

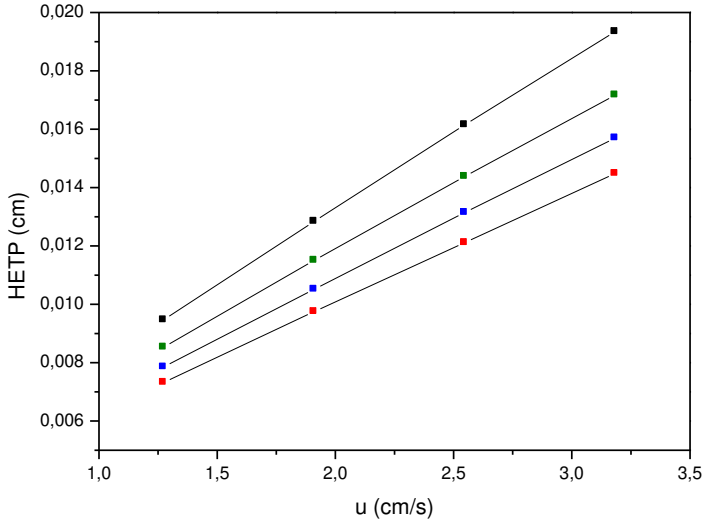


Figura 4.16-Curva de van Deemter para o S-(+)-sec a:(■)20°C; (■)25°C; (■)30°C e (■)35°C.

Os coeficientes lineares e angulares das retas apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16 representam os parâmetros A e C da equação de van Deemter (Equação 2.12), respectivamente.

Seus valores para os dois enantiômeros em diferentes temperaturas, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação das retas, estão indicados na Tabela 4.7**.**

Tabela 4.7 –Parâmetros A e C da equação de van Deemter para os enantiômeros do secnidazol.

	R-(-)-secnidazol			S-(+)-secnidazol		
T (°C)	**A x 10^3 (cm)**	**C x 10^3 (min)**	**r^2**	**A x 10^3 (cm)**	**C x 10^3 (min)**	**r^2**
20	2,19	2,21	0,99998	2,92	5,15	0,99992
25	2,16	1,93	0,99997	2,82	4,52	0,99990
30	2,12	1,76	0,99998	2,65	4,11	0,99995
35	2,10	1,62	0,99993	2,57	3,75	0,99998

A partir dos dados dos parâmetros de van Deemter, A e C, apresentados na Tabela 4.6 foram calculados os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L / u) e de transferência de massa global (k_m), através das Equações 2.17 e 2.18 que são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8–Valores de D_L / u e k_m obtidos a partir da análise dos momentos para os enantiômeros do secnidazol.

Temperatura (°C)	**D_L/u (cm)**		**km (min^{-1})**	
	R-(-)-secnidazol	**S-(+)-secnidazol**	**R-(-)-secnidazol**	**S-(+)-secnidazol**
20	2,84 x 10^{-2}	6,65 x 10^{-3}	8,1076	34,6250
25	2,88 x 10^{-2}	6,00 x 10^{-3}	7,9857	38,2646
30	2,88 x 10^{-2}	5,40 x 10^{-3}	7,9793	42,5564
35	2,85 x 10^{-2}	4,90 x 10^{-3}	8,0202	46,5660

Os valores de D_L / u estimados para os enantiômeros em cada temperatura apresentam intervalos coincidentes em todos os casos, mostrando que não há distinção entre os mecanismos de dispersão sofridos por cada uma das substâncias na direção axial. Os valores de k_m para o S-(+)-secnidazol aumentam com o aumento da temperatura, sugerindo que a resistência à transferência de massa diminui com o aumento da temperatura. Este fato pode ser explicado pelo decréscimo da viscosidade da fase móvel, aumentando a mobilidade do soluto no interior dos poros.

4.3.5. Análise termodinâmica de adsorção

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção, no processo de separação dos enantiômeros do secnidazol em coluna cromatográfica contendo fase estacionária Chiralpak® AD foram determinados pelo gráfico de van't Hoff, de acordo com as Equações 2.24 e 2.25. Os coeficientes angular e linear dados pela relação linear do gráfico de $\ln k$ vs $1/T$ permitem o cálculo, respectivamente, da entalpia e entropia de ambos enantiômeros no processo de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Bem como a relação linear do gráfico de $\ln \alpha$ vs $1/T$ permitem o cálculo da variação da entalpia e entropia. Esta relação, para fatores de retenção, é mostrada nas Figuras 4.17 e 4.18 para o R-(-)-secnidazol e o S-(+)-secnidazol, e para fatores de separação na Figura 4.19.

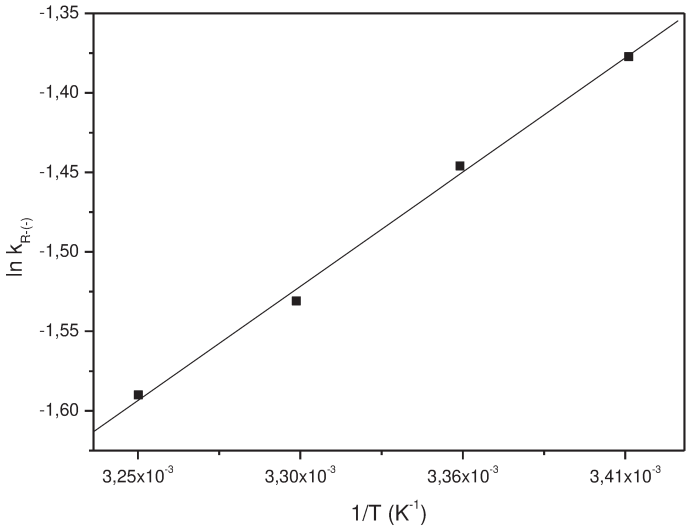


Figura 4.17- Dependência do fator de retenção k com a temperatura para o R-(-)-secnidazol a 1,0 mL/min.

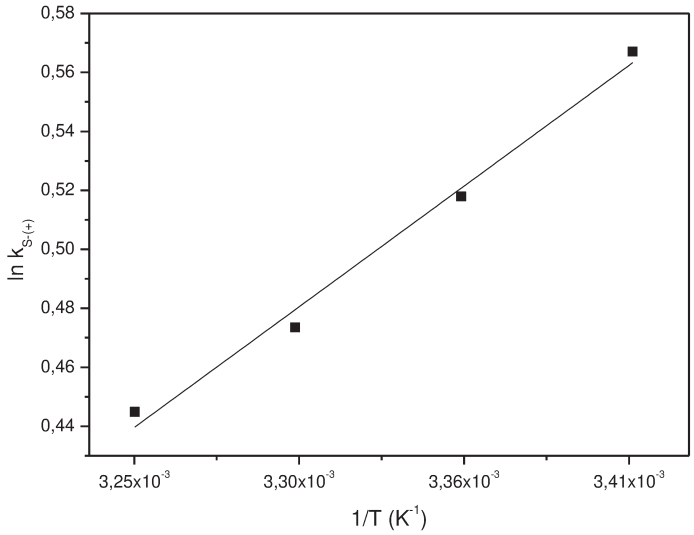


Figura 4.18- Dependência do fator de retenção k com a temperatura para o S-(+)-secnidazol a 1,0 mL/min.

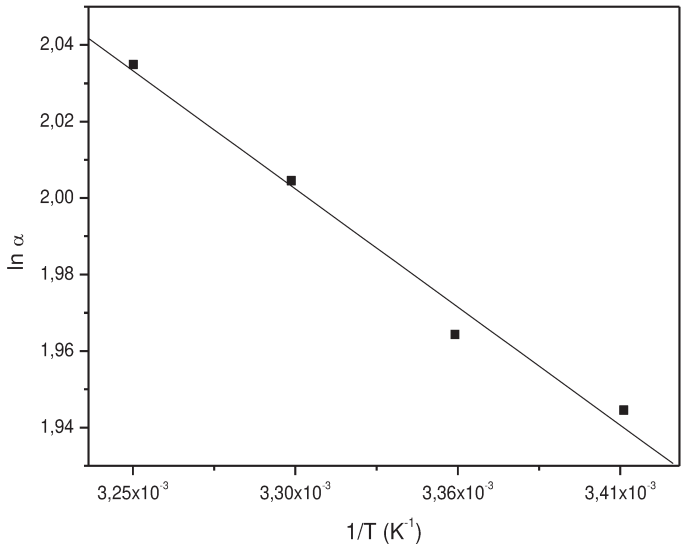


Figura 4.19- Dependência do fator de separação (α) com a temperatura para os enantiômeros do secnidazol a 1,0 mL/min.

Os gráficos de van't Hoff apresentaram um comportamento linear entre o logaritmo natural dos fatores de retenção e separação e o inverso da temperatura. Tal comportamento demonstra que a FEQ não sofre mudanças de conformação no intervalo de temperatura considerado. Neste caso, o mecanismo de reconhecimento quiral não é afetado pelo aumento da temperatura e os parâmetros termodinâmicos $\Delta H°$ e $\Delta S°$ são independentes da mesma (GOSSENS et al., 2004; ROJKOVICOVÁ et al., 2004). Além disso, os fatores de retenção dos enantiômeros decresceram com o aumento da temperatura da coluna. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de que os enantiômeros, em nível molecular, têm uma menor interação com a FEQ com a elevação da temperatura e por isso migram mais rápido através da coluna (CABUSAS, 1998; ZABKA e RODRIGUES, 2007). Os valores de $\Delta H°$ e ΔS^* da inclinação e interseção do gráfico $\ln k$ versus $1/T$, e os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$, determinados da inclinação e interseção do gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$, são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9–Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do secnidazol.

	$\Delta H°$ (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/K.mol)	R^2	$\Delta(\Delta H^0)$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta S^0)$ (kJ/K.mol)	R^2
R-(-)-Sec	-10,865	-0,04850	0,9982	4,670	32,059	0,9912
S-(+)-Sec	-6,190	-0,01578	0,9950			

Os valores negativos de $\Delta H°$ são indicativos que é mais favorável energeticamente ao soluto estar na fase estacionária do que em solução (FRANCOTTE, 2001). Além disso, o valor deste parâmetro foi maior para o enantiômero R-(-) devido a inversão da ordem de eluição dos enantiômeros. Pois de acordo com os experimentos realizados o enantiômero S-(+) possui maior interação com a FEQ.

A variação de entropia está relacionada a variações de ordem-desordem de um sistema. Quanto mais randômico for o sistema, maior a sua entropia. Portanto, os valores negativos de ΔS^* indicam que os enantiômeros do secnidazol encontram-se mais ordenados no estado adsorvido do que em solução. Segundo GOOSSENS et al. (2004), valores negativos de ΔS^*

indicam um aumento na ordem do sistema cromatográfico para o soluto ser transferido da fase móvel para a fase estacionária.

A temperatura de isoenantiosseletividade (T_{iso}) determinada foi de 152 K. Isso indica que ocorre inversão na ordem de eluição dos enantiômeros do secnidazol, o que já era previsto devido a utilização da fase móvel polar orgânica e o processo de separação é controlado por efeitos entrópicos, o que corrobora os valores de $\Delta(\Delta S^0)$ encontrados.

4.5. Experimentos com soluções concentradas

4.5.1. Estudo da sobrecarga da coluna

O método utilizado de avaliação de sobrecarga, com variação de volume de injeção a partir de uma única solução concentrada, foi indicado devido aos problemas de detecção nas altas concentrações da mistura racêmica de secnidazol na fase móvel. Conforme citado na literatura, a sobrecarga de concentração, é recomendada quando o soluto possui alta solubilidade na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com o aumento da concentração da solução injetada é esperado que os picos cromatográficos sejam muito distorcidos chegando a ter forma de um retangulo. O secnidazol possui elevada solubilidade (600 mg/mL), mas à medida que aumenta-se sua concentração na fase móvel, o mesmo começa a apresentar coloração amarelada, não sendo possível efetuar sua análise nos comprimentos de onda abrangido pelo detector.

A Figura 4.20 apresenta os cromatogramas, com diferentes volumes de injeção (20, 50, 100, 200, 500, 600 e 800 μL) de uma solução de secnidazol racêmico na concentração de 10 mg/mL, com vazão de fase móvel de 1,0 mL/min e temperatura controlada de 20°C.

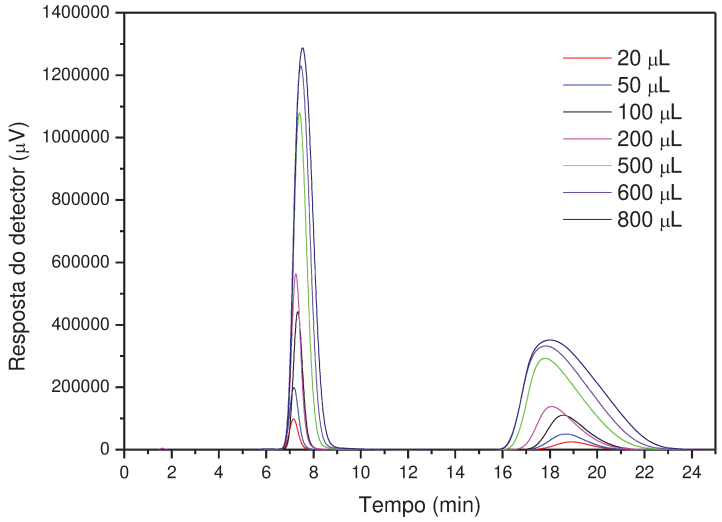


Figura 4.20- Cromatograma do secnidazol racêmico em condições de sobrecarga. $C_{solução}$=10 mg/mL e volumes de 20, 50, 100, 200, 500, 600 e 800 μL. Q= 1,0 mL/min, λ= 400 nm, FM= 60% IPA: 40% ACN e T= 20°C em FEQ Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 μm).

Nota-se que para volumes crescentes de injeção ocorre um aumento dos tempos de retenção para o R-(-)-secnidazol enquanto ocorre uma redução dos tempos de retenção para o S-(+)-secnidazol. Esse resultado jé era esperado, pois com o aumento no volume de injeção há uma maior quantidade de moléculas competindo pelos sítios de adsorção disponíveis e a saturação da coluna tende a acontecer mais rapidamente. O enantiômero mais retido S-(+)-secnidazol apresentou maior variação nos tempos de retenção para volumes de injeção de 500, 600 e 800 μL. Para os demais experimentos com variação do volume de injeção a variação no tempo de retenção foi proporcional. Com relação à largura dos picos cromatográficos, nota-se que o S-(+)-secnidazol perde em altura, entretanto aumenta a largura do pico. Já o enantiômero R-(-) não acontece o mesmo, o aumento de intensidade é constante com menor alargamento da base do pico. A Tabela 4.10 apresenta os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos obtidos experimentalmente para os enantiômeros do fármaco secnidazol.

Tabela 4.10–Tempos de inflexão dos picos cromatográficos no estudo de sobrecarga em coluna semi-preparativa Chiralpak® AD.

Volume de injeção (µL)	Massa injetada (mg)	Tempo de inflexão dos picos(min)	
		R-(-)-secnidazol	S-(+)-secnidazol
20	0,2	7,042	18,242
50	0,5	7,083	17,925
100	1,0	7,258	17,917
200	2,0	7,217	17,542
500	5,0	7,308	17,167
600	6,0	7,400	17,017
800	8,0	7,150	16,808

4.5.2. Isotermas de adsorção

A partir das curvas de isotermas de adsorção, pode-se obter informação a respeito do equilíbrio que se estabelece para os enantiômeros, entre as fases móvel e estacionária, durante a passagem pelo leito recheado. Os experimentos para obtenção das isotermas foram realizados utilizando-se o método da análise frontal, na temperatura de 25ºC e vazão de 2,00 mL/min, de acordo com a metodologia apresentada. As frentes de adsorção, na eluição dos enantiômeros pela coluna cromatográfica, podem ser observadas na Figura 4.21. Na Figura 4.22 estão apresentadas as curvas da derivada dos perfis de eluição nas concentrações estudadas. Percebe-se que há um ponto de mínimo (primeiro pico) da curva da derivada. Este fato pode ser comprovado pela Figura 4.23, que apresenta resultados de coletas realizadas minuto a minuto, durante a eluição dos enantiômeros. Até 13 minutos detectou-se apenas o menos retido. A concentração do enantiômero neste momento foi calculada por uma curva analítica previamente construída, nas mesmas condições do experimento, levando-se em conta a área sob o pico de eluição.

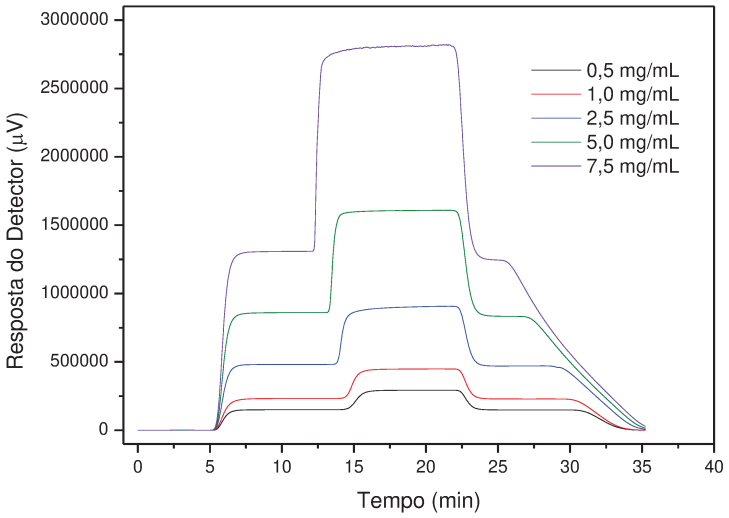


Figura 4.21 - Curvas de ruptura para a mistura racêmica do secnidazol para $C_{mistura}$= 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/ml, Q= 2,00 mL/min, FM= 60% IPA e 40% ACN, T= 25°C e λ= 380 nm.

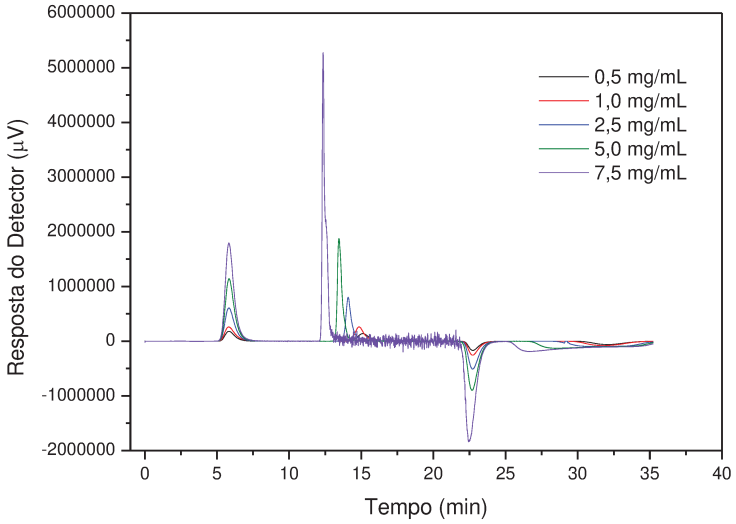


Figura 4.22- Derivada das curvas de ruptura apresentadas na Figura 4.32.

A concentração correspondente ao primeiro máximo da derivada (primeiro pico, Figura 4.22) foi considerada como a concentração no platô intermediário. O segundo máximo (segundo

pico, Figura 4.22) referiu-se à concentração da mistura enantiomérica. Para este experimento alimentou-se um volume de amostra igual a 34 mL (17 minutos de alimentação). Como pode ser observado nas figuras mencionadas, em tempo próximo a 15 minutos, a coluna atingiu seu estado de saturação e, a partir de então, a concentração na saída passou a ser igual a da alimentação.

O processo de dessorção baseou-se na mudança repentina da alimentação, que passou a ser composta unicamente pela fase móvel. Com menos de 40 minutos o sistema de análise praticamente não captava mais sinais de soluto. Observando-se a Figura 4.23 pode-se acompanhar a concentração dos enantiômeros ao longo da construção da curva de ruptura.

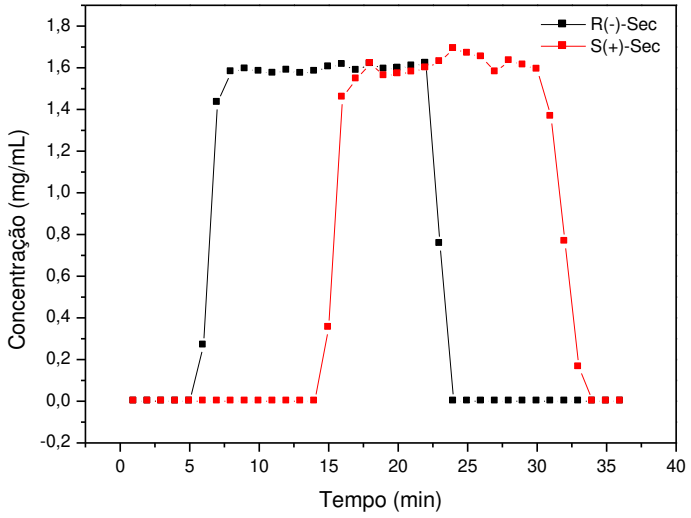


Figura 4.23- Análise das coletas realizadas durante a eluição. Q= 1,00 mL/min, v. injeção= 20 µL, FM= 60% IPA e 40% ACN, T = 25°C e λ= 380 nm.

Este experimento foi repetido para as concentrações 0,50; 2,50; 5,00 e 7,50 mg/mL nas mesmas condições experimentais. A Figura 4.24 mostra o gráfico de Scatchard (q/c versus q) dos enantiômeros do secnidazol. Dado a sua linearidade, o modelo de Langmuir foi diretamente correlacionado aos dados experimentais.

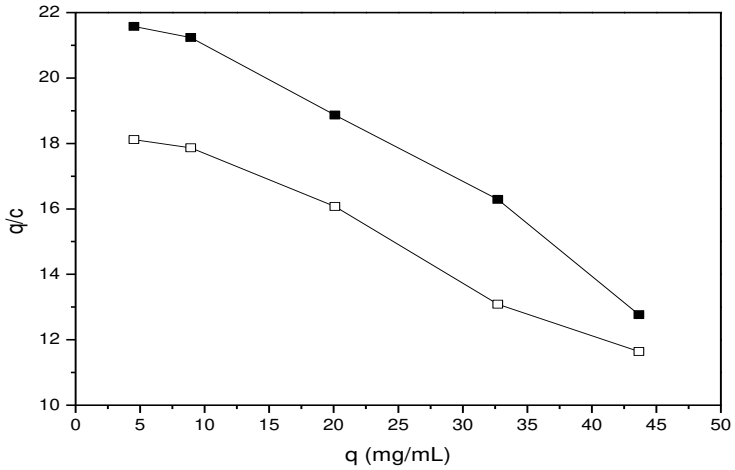


Figura 4.24- Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do secnidazol. FEQ Chiralpak® AD, FM= 60% IPA e 40% ACN, T = 25°C , λ= 380 nm e Q= 1,00 mL/min.(■) R-(-) e (□) S-(+).

As isotermas de adsorção obtidas para os enantiômeros do secnidazol, são apresentadas na Figura 4.25.

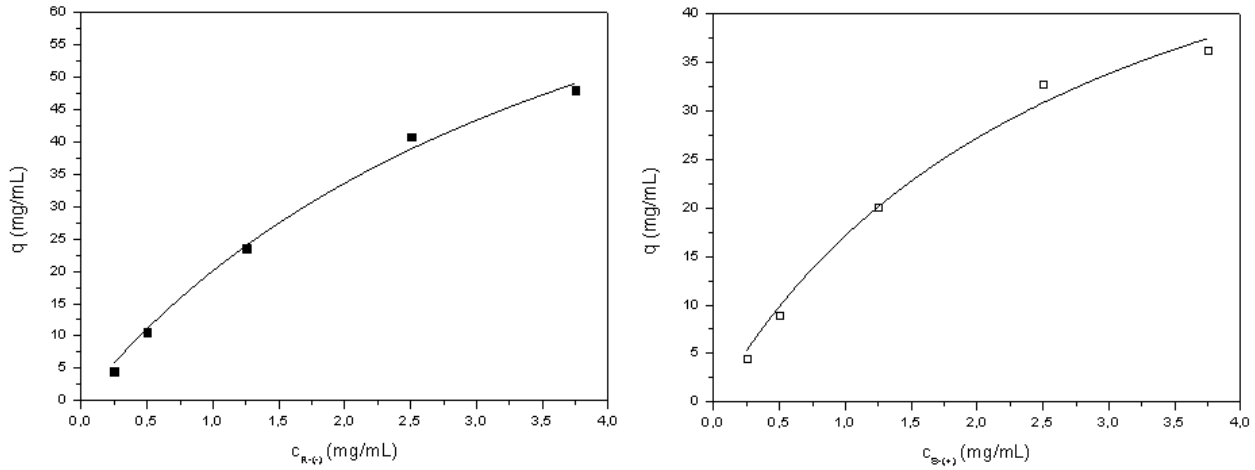


Figura 4.25- Isotermas de adsorção dos enantiômeros do secnidazol obtidas pelo método da análise frontal. FEQ Chiralpak® AD, FM= 60% IPA e 40% ACN, T = 25°C , λ= 380 nm e Q= 1,00 mL/min. (■) R-(-) e (□) S-(+).

A concentração de soluto adsorvida na fase estacionária (q) em equilíbrio com a concentração de soluto na fase móvel (c), foi calculada pela Equação 2.21. Os parâmetros do

modelo de Langmuir, constantes de equilíbrio (a e b) e capacidade de saturação da fase estacionária (q_s), estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11– Parâmetros do modelo de Langmuir.

	a	b (mL/mg)	q_s (mg/mL)	R^2
R-(-)-secnidazol	24,9564±2,340	0,2431±0,0552	102,659±2,340	0,99333
S-(+)-secnidazol	23,1798±2,748	0,3529±0,0849	65,684±2,748	0,98868

Os resultados obtidos para o valor da capacidade de saturação da FEQ comercial Chiralpak® AD estão de acordo com os dados reportados na literatura (23,60 – 177,90 mg/mL) (MIHLBACHLER et al., 2002b)

4.5.3.Cromatografia preparativa em leito móvel simulado

4.5.3.1. Obtenção dos parâmetros para separação pelo método *shortcut*

Os experimentos para aplicação do método *shortcut* foram realizados através de pulsos longos, utilizando uma coluna Chiralpak® AD, concentração da mistura racêmica de secnidazol de 2,50 mg/mL, temperatura de 20ºC, detecção a 398 nm e vazões de 2,00; 2,50; e 3,00 mL/min, de acordo com a metodologia empregada para obtenção das isotermas de adsorção.

A frente de adsorção, na eluição dos enantiômeros pela coluna cromatográfica na vazão de 3,00 mL/min pode ser observada na Figura 4.26. Foram coletadas amostras a cada minuto durante a eluição para obter as concentrações dos enantiômeros. A Figura 4.27 apresenta os resultados dessas coletas na vazão de 3,00 mL/min.

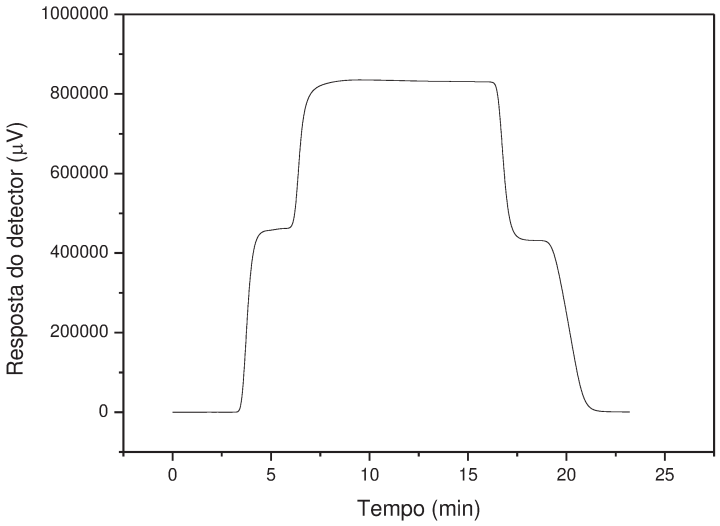


Figura 4.26 – Perfil de eluição para a mistura racêmica do secnidazol para $C_{mistura}$= 2,50 mg/ml, Q= 3,00 mL/min, FM= 60% IPA: 40% ACN, T= 25°C e λ= 380 nm.

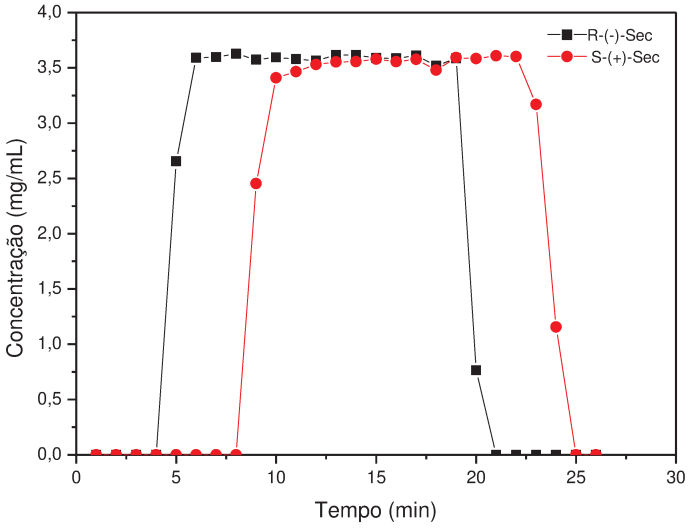


Figura 4.27- Perfil de concentração dos enantiômeros do secnidazol. Q= 2,50 mL/min, v. injeção= 20 µL, FM= 60% IPA: 40% ACN, T= 25°C e λ= 380 nm.

Através dos perfis obtidos com as vazões estudadas foram extraídos os valores do tempo de inflexão ($t_{\inf\ lexão}$), tempo a 5% do platô de concentração ($t_{5\%}$) e tempo a 95% do platô de concentração ($t_{95\%}$). Com esses dados foram obtidos os valores das velocidades de onda de choque (u_{sh}) e de onda de difusão (u_D) e do comprimento das zonas de transferência de massa (L_{ZTM}). A partir de regressões lineares dos dados de u_{sh}, u_D e L_{ZTM} em função da vazão foram obtidos os coeficientes x_n e y_n que serão utilizados nas Equações 2.23 a 2.26 para obtenção das vazões da zona de transferência de massa (Q_i) (Figuras 4.28 e 4.29).

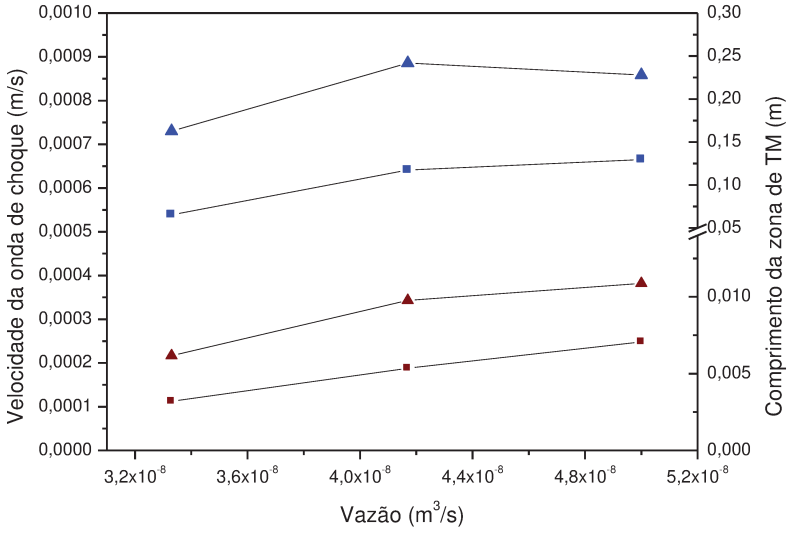


Figura 4.28- Velocidade da onda de choque (u_{sh}) (▲e■)e comprimento da zona de TM (L_{ZTM}) (▲e■)vs vazão (m^3/s) para obtenção de $x_{n=4}$ e $y_{n=4}$ onde ▲R-(-)-secnidazol e ■S-(+)-secnidazol.

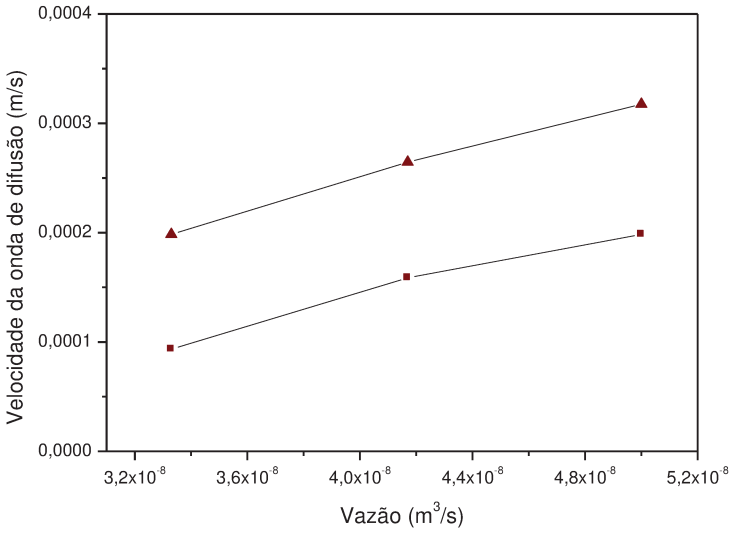


Figura 4.29- Velocidade da onda de difusão (u_D) vs vazão (m^3/s) para obtenção de $x_{5\ e\ 6}$ e $y_{5\ e\ 6}$ onde ▲R-(-)-secnidazol e ■S-(+)-secnidazol.

Com os valores de x_n e y_n inseridos nas Equações 2.23 à 2.26 foram encontrados os valores das vazões das zona de transferência de massa (Q_i) que são apresentados na Tabela 4.12:

Tabela 4.12–Vazões das zonas de transferência de massa calculadas através do método *shortcut*.

Q(I)=	4,37 x 10^{-8} m^3/s	∴	2,60 mL/min
Q(II)=	2,92 x 10^{-8} m^3/s	∴	1,70 mL/min
Q(III)=	3,92 x 10^{-8} m^3/s	∴	2,30 mL/min
Q(IV)=	2,31 x 10^{-8} m^3/s	∴	1,40 mL/min

Através das vazões das zonas de transferência de massa foram obtidos os parâmetros operacionais do leito móvel simulado, conforme mostrado na Tabela 4.13:

Tabela 4.13–Vazões das zonas de transferência de massa calculadas através do método *shortcut*.

Q(Alimentação)=	1,00 x 10^{-8} m^3/s	∴	0,60 mL/min
Q(Extato)=	1,46 x 10^{-8} m^3/s	∴	0,80 mL/min
Q(Refinado)=	1,60 x 10^{-8} m^3/s	∴	1,00 mL/min
Q(Eluente)=	2,06 x 10^{-8} m^3/s	∴	1,20 mL/min
Tempo de troca=	5,69 x 10^{2} s	∴	9,50 min

Os parâmetros operacionais foram alimentados no software do equipamento leito móvel simulado conforme ilustra a Figura 4.30:

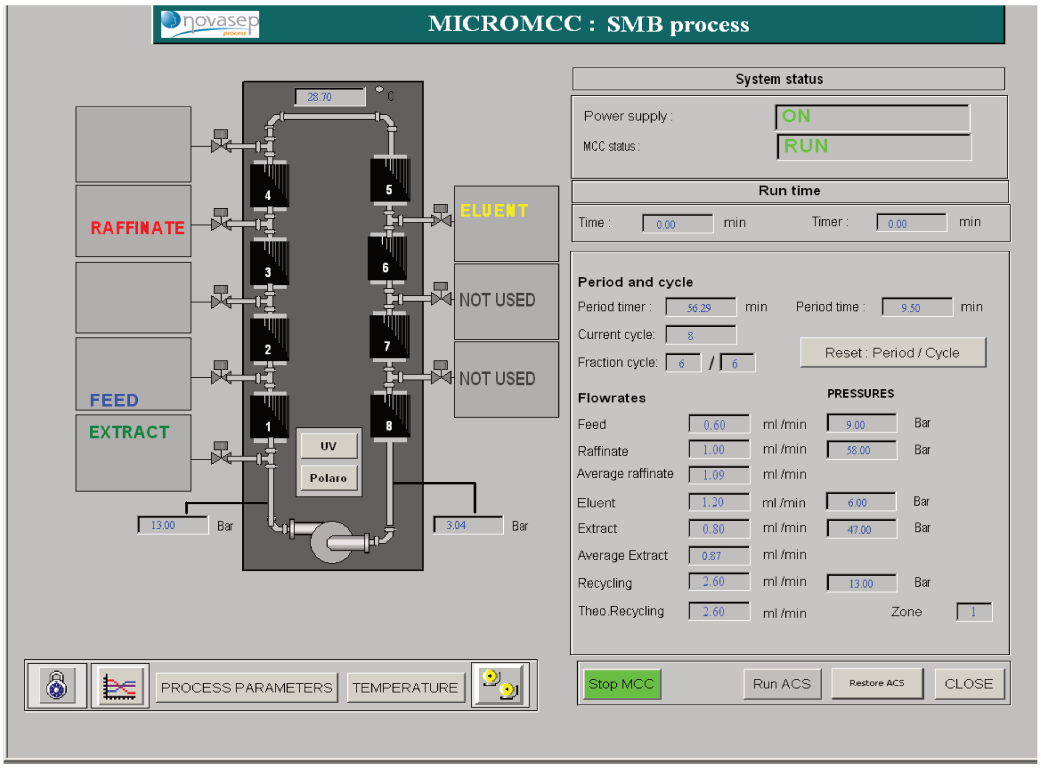


Figura 4.30- Alimentação dos parâmetros operacionais do leito móvel simulado.

4.5.3.2. Resultados experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando-se 6 colunas semi-preparativas Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm) conectadas em série na configuração 1-1-2-2 (1 coluna nas zonas I e

II e 2 colunas nas zonas 3 e 4) (de acordo com a metodologia descrita por XIE et al., 2003) com concentração de alimentação da mistura racêmica de secnidazol de 7,0 mg/mL. A temperatura de operação foi mantida constante e igual a 25°C e a comprimento de onde de detecção de 360 nm.

4.5.3.2.1. Perfis dos detectores UV e polarímetro

A Figura 4.31 mostra os perfis dos detectores UV e polarímetro para o ciclo 08. É válido ressaltar a partir destes perfis a diferenciação do sinal indicando a separação progressiva dos enantiômeros do secnidazol ao longo dos ciclos até atingir o estado estacionário, cujas purezas ficam mantidas ao longo da corrida experimental. Mais uma vez pudemos comprovar que o enantiômero menos retido trata-se do R-(-)-sec e o mais retido o S-(+)-sec.

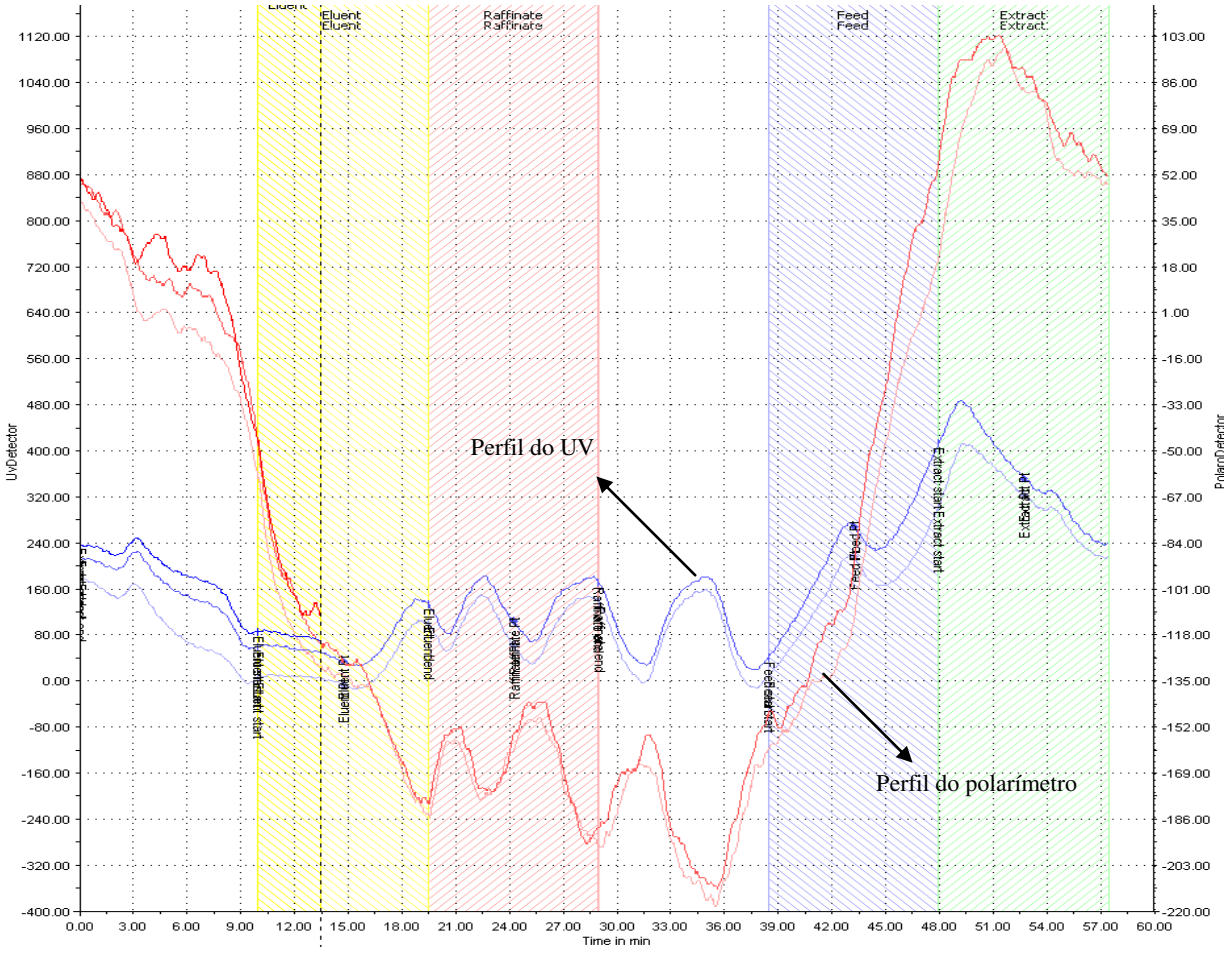


Figura 4.31 – Perfis do UV e do polarímetro no ciclo 08.

4.5.3.2.2. Purezas enantioméricas

As purezas dos enantiômeros foram determinadas experimentalmente utilizando-se coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 μm), recheada com fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. As análises de pureza foram realizadas em um cromatógrafo a líquido (Capítulo 3, seção 3.1.5.1).

Foram obtidos valores de purezas globais iguais a 72,5% e 85,5% para o refinado (R-(-)-secnidazol) e extrato (S-(+)-secnidazol), respectivamente. A pureza global refere-se as amostras coletadas ao longo de todos os ciclos ocorridos durante a corrida experimental com o leito móvel simulado. As purezas foram determinadas através dos cromatogramas representados pelas Figuras 4.32 e 4.33, à partir das áreas dos picos cromatográficos referentes a cada enantiômero.

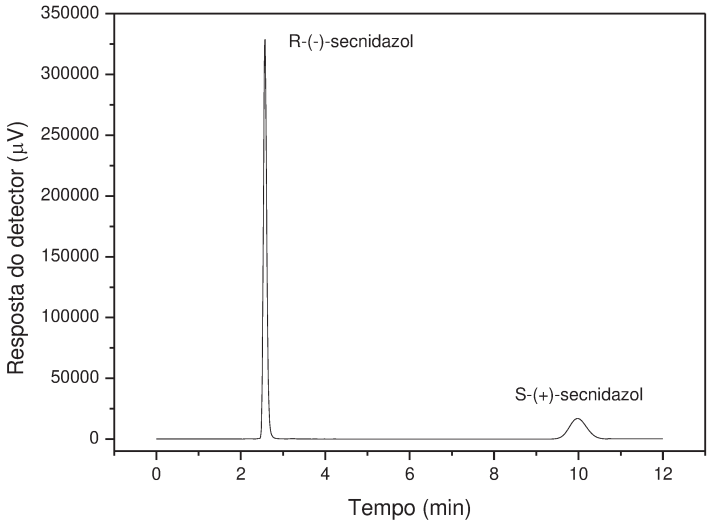


Figura 4.32 – Cromatograma obtido para análise da pureza do enantiômero R-(-)-secnidazol na corrente de refinado. Q= 1,50 mL/min, FM= 60% IPA: 40% ACN, T= 25°C, Vol. inj= 20 μL e λ= 380 nm.

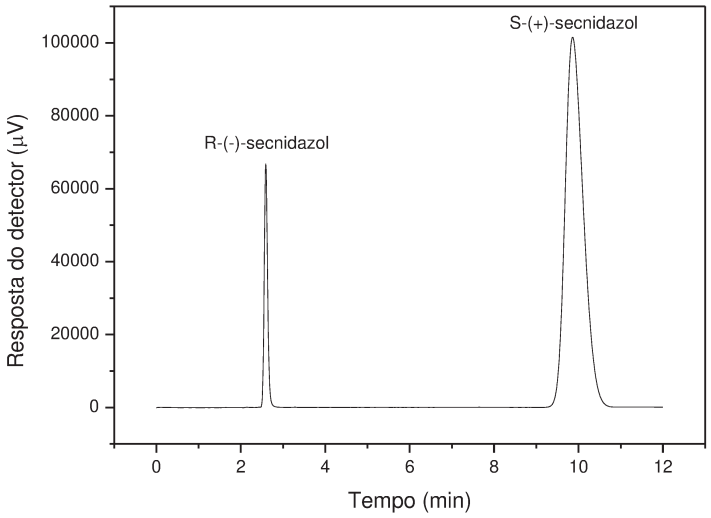


Figura 4.33 – Cromatograma obtido para análise da pureza do enantiômero S-(+)-secnidazol na corrente de extrato. Q= 1,50 mL/min, FM= 60% IPA: 40% ACN, T= 25°C, Vol. inj= 20 μL e λ= 380 nm.

4.5.3.2.3. Tabela-resumo da separação do secnidazol em LMS

A Tabela 4.14 apresenta os principais parâmetros operacionais utilizados na separação do secnidazol, contendo os dados fundamentais para a separação por cromatografia contínua.

É válido ressaltar que os dados apresentados até o momento constituem no primeiro conjunto de resultados decorrentes do uso da cromatografia contínua em leito móvel simulado para a separação da molécula do fármaco secnidazol. Torna-se importante frisar que apesar das baixas purezas enantioméricas obtidas pudemos comprovar que o método *shortcut* pode ser utilizado para separação de fármacos quirais. Não foram determinados os cálculos de produtividade e consumo de solvente por se tratar de uma análise para implementação do referido método.

Tabela 4.14– Tabela dos parâmetros operacionais da separação dos enantiômeros do secnidazol em leito móvel simulado.

Parâmetros operacionais	
Coluna	Tris-(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose
Fase móvel	Isopropanol: acetonitrila (60: 40%, v/v)
Número de colunas	6 (cada uma com 6 gramas de fase estacionária quiral)
Comprimento da coluna	100 mm
Diâmetro interno da coluna	10 mm
Concentração de alimentação	7,0 g/L
Vazão de alimentação	0,60 mL/min
Vazão de eluente	1,20 mL/min
Vazão de extrato	0,80 mL/min
Vazão de refinado	1,00 mL/min
Tempo de troca	9,50 min
Temperatura	25°C
Pressão	47 bar

Capítulo 5

Conclusões

O presente trabalho relata a determinação dos parâmetros fundamentais para a separação dos enantiômeros do secnidazol, bem como o projeto de condições operacionais do LMS. Para a determinação dos parâmetros cromatográficos, um procedimento sistemático foi realizado com a finalidade de descrever e quantificar a forma como ocorre a separação dos enantiômeros do secnidazol utilizando uma coluna quiral Chiralpak® AD.

Os resultados alcançados com o trabalho demonstraram a alta eficiência de separação dos enantiômeros do secnidazol na fase estacionária tris-3-5-dimetilfenilcarbamato de amilose, com destaque para a condição de 1,00 mL/min e 35ºC que, no processo de separação resultou em mais de 2300 pratos para o enantiômero menos retido e mais de 1300 pratos para o mais retido. A fase móvel definida para realização dos experimentos baseou-se em IPA:ACN (60:40, v/v). A separação ocorreu até a linha de base para todas as vazões e temperaturas estudadas. Com o auxílio do dicroísmo circular e da configuração absoluta pode-se verificar que o enantiômero menos retido na coluna trata-se do (R)-(-)-secnidazol e o mais retido (S)-(+)-secnidazol.

Os parâmetros analíticos de separação e os coeficientes de transferência de massa foram favoráveis à separação dos enantiômeros. Estes parâmetros revelaram que a separação acontece com alta resolução. Os valores de seletividade maiores que 7,00 na maioria das condições experimentais testadas demonstraram o excelente potencial de separação dos enantiômeros nas condições especificadas no trabalho.

O enantiômero S-(+)-secnidazol possui maior afinidade com a fase estacionária, apresentando valores dos coeficientes de Henry 7 vezes maiores que para o R-(-)-secnidazol. As variáveis vazão de fase móvel e temperatura mostraram-se importantes quando se deseja realizar

o escalonamento do sistema. Elas atuaram diretamente na resolução e no fenômeno de transferência de massa no interior da coluna. Picos mais resolvidos foram alcançados nas condições de baixas vazão e temperatura.

Os valores negativos para as grandezas termodinâmicos comprovaram que é favorável energeticamente aos solutos adsorverem-se à fase estacionária e, isto ocorre com predomínio da entropia.

As isotermas de adsorção foram determinadas pelo método da análise frontal até a concentração de 7,5 mg/mL da mistura racêmica, e indicaram uma alta capacidade de adsorção do secnidazol na FEQ estudada. As isotermas foram bem ajustadas pelo modelo de Langmuir. A coluna apresentou um alto desempenho de separação em condições de sobrecarga.

Com base nos resultados apresentados foram determinados as condições operacionais da unidade LMS, desconsiderando a influência das resistência à transferência de massa, com base na metodologia *shortcut*. Partindo-se das condições operacionais foram obtidas purezas de 85,50% para o enantiômero S-(+) na corrente de extrato e 72,50% para o enantiômero R-(-) na corrente de refinado.

A separação do secnidazol em uma unidade LMS utilizando o método *shortcut*, contendo seis colunas Chiralpak® AD (configuração 1-1-2-2), pode ser realizada experimentalmente com sucesso.

Capítulo 6

Atividades Futuras

Para trabalhos futuros ou relacionados a este assunto fica como sugestão avaliar o desempenho de separação do secnidazol em colunas empacotadas com fases estacionárias tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (Chiracel ® OD) e tris(S-α-metilfenilcarbamato) de amilose (Chiralpak® AS).

Realização da separação do secnidazol no sistema de leito móvel simulado, utilizando as metodologias existentes na literatura para obtenção dos parâmetros operacionais.

Obtenção de uma molécula que seja capaz de determinar a porosidade das partículas (ε_p) sem a necessidade de utilizar correlações existentes na literatura.

Realização da separação do secnidazol no sistema VARICOL® para possível comparação com a separação obtida em leito móvel simulado.

À partir dos enantiômeros puros do secnidazol, realizar a determinação da configuração absoluta, sem a necessidade da obtenção do derivado correspondente como realizado por TIAN et al., 2003) bem como a verificação da atividade biológica..

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Comparison of the chiral resolution of econazole, miconazole, and sulconazole by HPLC using normal-phase amylose CSPs. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.370, p. 951-955, 2001.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptides antibiotic chiral stationary phases. IL *Farmaco*, v.57, p. 513-529, 2002.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Introducion. *Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies.* DOI: 10.1201/9780203911112, 2003. p 1-20.

AHUJA, S. *Chiral Separations by Chromatography*. New York, Oxford University Press, 2000. 256 p.

ALI, I.; GUPTA, V.K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Chirality: A challenge for the environmental scientists. *Current Science*, v.84, no.2 p. 152-156, 2003.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mechanistic Principles in Chiral Separations using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Chromatographia*, v.63, p. 295-307, 2006.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GAITONDE, V.D.; SINGH, P.; RAWAT, M.S.M.; SHARMA, B. Chiral Separations of imidazole Antifungal Drugs on AmyCoat RP Column in HPLC. *Chromatographia*, v.70, p. 223-227, 2009.

ARGENTON, A. Minicursos 2010 – Conceitos fundamentais de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). *Conselho Regional de Química- IV Região (SP),* 2010.

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

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

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

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

AZEVEDO, D.C.S.; PAIS, L.S.; RODRIGUES, A.E. Enantiomers separation by simulated moving bed chromatography. Non-instantaneous equilibrium at the solid–fluid interface. *Journal of Chromatography A*, v.865, p. 187-200, 1999.

AZEVEDO, D.C.S.; RODRIGUES, A.E. Fructose-Glucose separation in a SMB pilot unit: modeling, simulation, design, and operation. *AIChE Journal*, v.47, n.9, p.2042- 2051, 2001.

BACKER, E.; DUBREUIL, L.; BRAUMAN, M.; ACAR, J.; VANEECHOUTTE, M. In vitro activity of secnidazole against Atopobium vaginae, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. *Clinical Microbial Infect,* v.16, p. 470-472, 2010.

BAKSHI, M.; SINGH, S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability – indicating high-performance liquid chromatographic assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.36, p. 769-775, 2004.

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

BENAZET, P.F.; GUILLAUME, L. Activités antiamibienne et trichomonacide du secnidazole au laboratoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, n. 4, p. 309-319, 1976.

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

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Química Nova*, v.82, n. 4, p. 683-691, 2005.

BUBNIK, Z.; POUR, V.; GRUBEROVA, A.; STARHOVA, H.; HINKOVA, A.; KADLEC, P. Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. *Journal of Food Engineering,* v.61, p.509-513, 2004.

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.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

CABUSAS, M. H. Y. *Chiral separations on HPLC derivatized polysaccharide CSPs: temperature, mobile phase and chiral recognition mechanism studies*. 1998. Thesis (PhD)- Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1998.

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bionalytical monitoring in drug development. *Journal of Chromatography A*, v.719, p. 3-13, 1996.

CARNER, H.; GRONER, E.; LEVY,L. Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discovery Today,* v.09, p. 105-110, 2004.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.* São Carlos: Editora UFSCar, 2001. 77 p.

CAVAZZINI, A. et al. Modeling of the separation of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate. *Analytical Chemistry,* v. 73, p. 5704-5715, 2001.

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.

CIRILLI, R.; LA TORRE, F. Stereoselective analysis of benazepril and its stereoisomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a chiral AGP column. *Journal of Chromatography A*, v. 818, p. 53-60, 1998.

COLLINS, C.H; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia.* Campinas: Editora Unicamp, 2006. 456 p.

CORDATO, D.J.; MATHER, L.E.; HERKES, G.K. Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *Journal of Clinical Neuroscience,* v. 10, no. 6, p. 649-654, 2003.

COX, G.B. *Preparative Enantioselective Chromatography*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 330 p.

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.

CREMASCO, M.A.; WANG, N.H.L. A design and study of the effect of selectivity on binary separation in a four-zone simulated moving bed for systems with linear isotherms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering,* v.20, n.2, p.181-190, 2003.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

DANTUS, M.M.; WELLS, L.M. Regulatory issues in chromatographic analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 27, n.7-9, p.1413-1442, 2004.

DAVANKOV, V.A. Analytical chiral separation methods. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 69, no.7, p. 1469-1474, 1997.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIAS, R. M.. *Separação cromatográfica quiral o, p'-Diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária quiral o, o'bis [4-tercbutilbenzoil]-n, n'-dialil-l-tartardiamida.* 2007. 152p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007

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

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

FRANCOTTE, E. R.; RICHERT, P.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Simulated moving bed chromatographic resolution of a chiral antitussive. *Journal of Chromatography A,* v.796, p.239-248, 1998.

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

FRANCOTTE, E.R. Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography. *Preparative Enantioselective Chromatography.* Edited by Geoffrey B. Cox, 2005. p. 48-77.

FORNSTEDT, T.; SAJONZ, P.; GUIOCHON, G. Thermodynamic Study of an Unusual Chiral Separation: Propanolol Enantiomers on an Immobilized Cellulase. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, p. 1254-1264, 1997.

FORNSTEDT, T.; GÖTMAR, G.; ANDERSSON, M.; GUIOCHON, G. Dependence on the mobile-phase pH of the adsorption behavior of propanolol enantiomers on a cellulose protein used as the chiral selector. *Journal of American Chemical Society*, v.121, p. 1164-1174, 1999.

GILLIS, J.C.; WISEMAN, L.R. Secnidazole- A Review of its Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in the Management of Protozoal Infections and Bacterial Vaginosis. *Drug Evaluation*, v. 51, p. 621-638, 1996.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

GOOSSENS, J.F.; FOULON, C., BAILLY, C.; BIGG, D.C.H.; BONTE, J.P.; VACCHER, C. Chiral resolution of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases. *Chromatographia*, v.59, nos 5/6 p. 305-313, 2004.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. New thermodynamically consistent competitive adsorption isotherm in RPLC. *Journal of Colloid and Interface Science.* v. 264, p. 43-59, 2003.

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.

GUENNES, P.L. On the concept of chirality. *Journal of Mathematical Chemistry*, v.23, p. 429-439, 1998.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S.G.; KATTI, A.M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Boston, MA: Academic Press, 1994. 701 p.

GUIOCHON, G.; LIN,B. *Modeling for preparative chromatography*. San Diego, California: Academic Press, 2003. 354 p.

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

JAMES, 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.

KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *The Royal Society of Chemistry*, v. 39, p. 4466-4503, 2010.

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

KURUP, A.S.; HIDAJAT, K.; RAY, A.K. Optimal operation of an industrial scale parex process for the recovery of p-Xylene from a mixture of C8 aromatics. *Industrial and Engineering Chemical Research,* v.44, p.5703-5714, 2005.

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.

LEE, H. J.; XIE, Y.; KOO, Y.M.; WANG, N.H.L. Separation of lactic acid from acetic acid using a four-zone SMB. *Biotechnology Progress*, v.20, p.179-192, 2004.

LEIROS, H.K.S.; KOZIELSKI-STUHRMANN, S.; KAPP, U.; TERRADOT, L.; LEONARD, G.A.; MCSWEENEY, S.M. Structural Basis of 5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, no.53, p. 55840-55849, 2004.

LIAO, S.; WANG, X.; LIN, X.; XIE, W. Preparation and characterization of a molecularly imprinted monolithic column for pressure-assisted CEC separation of nitroimidazole drugs. *Electrophoresis*, v. 31, p. 2822-2830, 2010.

LI, B.; HAYNIE, D.T. Chiral Drug Separation. *Encyclopedia of Chemical Processing*, DOI: 10.1081, 2006.p. 449-459.

LIMA, V.L.E. Os Fármacos e a Quiralidade: Uma breve abordagem. *Química Nova*, v. 20, no.6, p. 657-664, 1997.

LIN, G.Q.; ZHANG, J.G.; CHENG, J.F. Overview of Chirality and Chiral Drugs. *Chiral Drugs – Chemistry and Biological Action*. John Wiley & Sons. Inc, ISBN: 978-0-470-58720-1, 2011. p.3-28.

LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 33, no. 10, p. 2155-2164, 2010.

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

MALLMANN, T.; BURRIS, B.D.; MA, Z.; WANG, N. H.L. Standing wave design of nonlinear SMB systems for fructose purification. *AIChE Journal*, v.44, n.2, p.2628- 2646, 1998.

MARCHERY-NAGEL. *Guia para colunas cromatográficas.* 2001.p. 62-66.

MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Robust design of countercurrent adsorption separation: 3. Nonstoichiometric systems. *AIChE Journal*, v.42, no. 10, p.2784-2796, 1996.

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

MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; ZENONI, G.; MORBIDELLI, M. Shortcut experimental method for designing chiral SMB separation. *AIChE Journal*, v. 48, p. 69-77, 2002.

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.

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

MINCEVA, M.; PAIS, L.S.; RODRIGUES, A.L. Cyclic steady state of simulated moving bed process for enantiomers separation. *Chemical Engineering and Processing*, v.42, p.93-104, 2003.

MITAL, A. Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Scientia Pharmaceutica*, v. 77, p. 497-520, 2009.

MIYABE, K.; SUZUKI, M. Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v.38, p.901-910, 1992.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Kinetic study of the concentration dependence of the mass transfer rate coefficient in anion-exchange chromatography of bovine serum albumin. *Biotechnology Progress*, v. 15, p.740-752, 1999.

MOLNÁR, Z.; NAGY, M.; ARANYI, A.; HANÁK, L.; SZÁNYA, T.; ARGYELÁN, J. Simulated moving bed liquid chromatography with three zones for continuous desalting of organic compounds. *Chromatographia*, v.60, p.S75-S80, 2004.

MOLNÁR, Z.; NAGY, M.; ARANYI, A.; HANÁK, L.; ARGYELÁN, J.; PENCZ, I.; SZÁNYA, T. Separation of amino acids with simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1075, p.77-86, 2005.

NOTOWICZ, A.; STOLZ, E.; DE KONING, G.A.J. The nitroimidazole family of drug. *British Journal of Veneral Diseases*, v. 54, p. 69-71, 1978.

NÚÑEZ, J.T.; GÓMEZ, G. Low-dose secnidazole in treatment of bacterial vaginosis. International *Journal Gynecology and Obstetrics*, v. 88, p. 281-285, 2005.

OKAMOTO, Y.; IKAI, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chemical Society Reviews,* v. 37, p. 2593-2608, 2008.

ORLANDO, R.M.; FILHO, N.C.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, ISSN 1808-0804, v. IV, no. 1, p. 08-14, 2007.

PALHARES, D. Secnidazole for Metronidazole-Resistant Amebiasis. *Brasília Médica*, v. 45, no. 4, p. 309-310, 2008.

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.

PINTO, M.F.; MOURA, E.A.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O. Thermal compatibility studies of nitroimidazoles and excipients. *Journal Thermal Analysis and Calorimetry*, v.102, p. 323-329, 2010.

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.

RAETHER, W.; HÄNEL,H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, v. 90, p. S19-S39, 2003.

RAJENDRAN, A.; PEPER, S.; JOHANSSEN, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M.; BRUNNER, G. Enantioseparation of 1-phenyl-1-propanol by supercritical fluid simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1092, p.55-64, 2005.

REDDY, I.K.; MEHVAR, R. *Chirality in Drug Design and Development*. Library of Congress, ISBN: 0-8247-5062-4, 2004. 1200 p.

RENTSCH, K.M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 54, p. 01-09, 2002.

RIVERA, A.B.; HERNÁNDEZ, R.G.; ARMAS, H.N., ELIZÁSTEGI, D.M.C.; LOSADA, M.V. Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole. *II Farmaco*, v. 55, p. 700-707, 2000.

RODRIGUES, A.E.; PAIS, L.S. Design of SMB chiral separations using the concept of separation volume. *Separation Science and Technology*, v.39, n.2, p.245-270, 2004.

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

ROSA, P.C.P. *Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (0,0'bis [4-tercbutilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida).* 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005

RUTHVEN, D.M. *Principles of adsorption an adsorption process*. New York, USA John Wiley & Sons, 1984. 453 p.

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.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

SANTOS, M.A.G. *Separação dos enantiômeros do anestésico cetamina por cromatografia em leito móvel simulado.* 2004. 167 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004

SANTOS, M.A.G.; VEREDAS, V.; SILVA Jr., I.J.; CORREIA, C.D.R.; FURLAN, L.T.; SANTANA, C.C. Simulated moving bed adsorption for separation of racemic mixtures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.21, n.1, p.127-136, 2004.

SARTOR, J.P. *Separação cromatográfica do fármaco rolipram utilizando fase estacionária 0,0'bis [4-tercbutilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida.* 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006

SCHLAUCH, M.; FRAHM, A. W. A Thermodynamic Study of the Temperature Dependent Elution Order of Cyclic α-amio Acid Enantiomers on a Copper(II)-Dpenicillamine chiral stationary phase. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 262-266, 2001.

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

SCHURIG, V. Enantiomer separation by gas chromatography on chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A,* v.666, p. 111-129, 1994.

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

SEWELL, P.A.; CLARKE, B.; KEALEY, D. *Chromatographic Separations*. John Wiley, 1987. 335 p.

SHEN, J.; IKAI, T.; OKAMOTO, Y. Synthesis and chiral recognition of novel amylose derivatives containing regio selectively benzoate and phenylcarbamate groups. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1041-1047, 2010.

SILVA, V.M.T.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A.E. Novel analytical solution for a simulated moving bed in the presence of mass-transfer resistance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.43, p.4494-4502, 2004.

SILVA JR, I.J. *Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina*. 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas,Campinas. 2003.

SILVA JR, I.J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1027-1037,2006.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

SILVA JR, I.J.; BARRETO JR, A.G.; SANTANA, C.C. Separação cromatográfica quiral de anestésicos a partir de soluções diluídas e concentradas em escala preparativa. *Química Nova*, v. 32, n.2, p. 359-364,2009.

SMITH, D.F. The stereoselectivity of drug action. *Pharmacology & Toxicology,* v. 65, p. 321-331, 1989.

SMITH, S.W. Chiral toxicology: It's the same thing… Only different. *Toxicological Sciences,* v. 110, n.1, p. 04-30, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. Basic concepts and control of separation. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. p. 15-82.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. *Organic Chemistry V*. United States Of America: Library of Congress , 7th edition, 2000. 1272 p.

SUBRA, P.; VEGA-BANCEL, A.; REVERCHON, E. Breakthrough curves and adsorption isotherms of terpene mixtures in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 12, p. 43-57, 1998.

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.

SUTEU, C. Method development for preparative enantioselective chromatography. *Preparative Enantioselective Chromatography*, p.78-109, 2005.

WAGNIÈRE, G.H. *On Chirality and the Universal Asymmetry*. Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta, ISBN: 978-3-906390-38-3. 2007. 256 p.

WANG, T.; WENSLOW, J.R.M. Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v.1015, p.99-110, 2003.

WANG, X.; CHING, C.B. Chiral separation and modeling of the three-chiral center β-blocker drug nadolol by simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1035, p.167-176, 2004.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reserved-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v.906, p.127-154, 2001.

TIAN, P.; PENG, J.; LI, Z.; LIN, G. Lipase-Catalyzed resolutions of both enantiomers of ornidazole and secnidazole. *Chinese Journal of Chemistry*, v.21, p.853-857, 2003.

UPCROFT, J.A.; CAMPBELL, R.W.; BENAKLI, K.; UPCROFT, P.; VANELE, P. Efficacy of New 5-Nitroimidazoles against Metronidazole-Susceptible and –Resistant Giardia, Trichomonas, and Entamoeba spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n.1, p. 73-76, 1999.

VEREDAS, V.; CARPES, M.J.S.; DUARTE, C.R.C.; SANTANA, C.C. Continuous chromatographic separation of a baclofen precursor (N-Boc-4-[p-chloro-phenyl]-2-pyrrolidone) in a simulated moving bed using a polysaccharide carbamate as chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v.119, p.156-162, 2006.

XIE, Y.; WU, D.; MA, Z.; WANG, N.H.L. Extended standing wave design method for simulated moving bed chromatography: linear systems. *Industrial and Engineering Chemical Research*, v.42, p.4055-4067, 2000.

XIE, Y.; FARRENBURG, C.A.; CHIN, C.Y.; MUN, S.; WANG, N. H.L. Design of SMB for a nonlinear amino acid system with mass-transfer effects. *AIChE Journal*., v. 49, p. 2850-2863, 2003.

ZABKA, M.; RODRIGUES, A. E. Thermodynamic and kinetic study of adsorption of R,S-α-tetralol enantiomers on the chiral adsorbent CHIRALPAK AD. *Separation Science and Technology*, v.426, p. 739-768, 2007.

ZHANG, Y.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatographic processes with a small number of columns: comparison of simulated moving bed with Varicol, Power Feed and ModiCon. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 21, p. 454-464,2004.

ZHAO, Y.; PRITTS, W. Chiral separation of selected proline derivatives using a polysaccharide type stationary phase by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A,* v. 1156, p. 228-235, 2007.