



ABSOLON CARVALHO DA SILVA JUNIOR

**“APLICAÇÃO DO PROCESSO DE
CROMATOGRÁFIA CONTÍNUA (VARICOL) NA
SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO
MITOTANO UTILIZANDO A FASE
ESTACIONÁRIA QUIRAL *TRIS*-
3,5(DIMETILFENILCARBAMATO) DE AMILOSE”**

CAMPINAS
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ABSOLON CARVALHO DA SILVA JUNIOR

**“APLICAÇÃO DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA CONTÍNUA
(VARICOL) NA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MITOTANO
UTILIZANDO A FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL *TRIS*-
3,5(DIMETILFENILCARBAMATO) DE AMIOSE”**

Orientador(a): Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa da Pós
Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO ABSOLON CARVALHO DA SILVA JUNIOR
E ORIENTADO PELO PROF. DR. CESAR COSTAPINTO SANTANA**

Assinatura do orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cesar Costapinto Santana", is written over a horizontal line.

**CAMPINAS
2012**

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

Si38a Silva Junior, Absolon Carvalho da
Aplicação do processo de cromatografia contínua
(Varicol) na separação dos enantiômeros do mitotano
utilizando a fase estacionária quiral tris-
3,5(dimetilfenilcarbamato) de amilose / Absolon
Carvalho da Silva Junior. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Cesar Costapinto Santana
Coorientador: Marco Aurélio Cremasco.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2.
Adsorção. 3. Enantiômeros. 4. Leito móvel simulado.
I. Santana, Cesar Costapinto, 1948-. II. Cremasco,
Marco Aurélio, 1962-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Título em Inglês: Application of the continuous chromatography (Varicol) in the
separation of mitotane enantiomers using a chiral stationary phase
amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)

Palavras-chave em Inglês: High performance liquid chromatography, Adsorption,
Enantiomers, Simulated moving bed

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

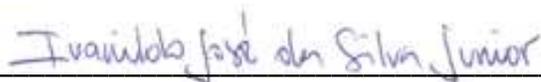
Banca examinadora: Ivanildo José da Silva Junior, Amaro Gomes Barreto Junior,
Vinicius Veredas, Antonio Carlos Luz Lisboa

Data da defesa: 23-11-2012

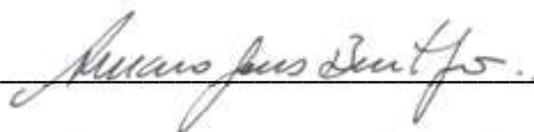
Tese de Doutorado defendida por Absolon Carvalho da Silva Junior e aprovada em 23 de novembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



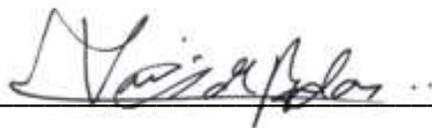
Prof. Dr. César Costapinto Santana



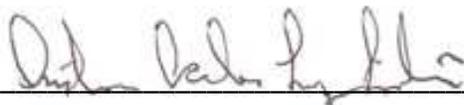
Prof. Ivanildo José da Silva Junior



Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Junior



Dr. Vinícius Veredas



Prof. Dr. Antonio Carlos Luz Lisboa

Dedico este trabalho

*Aos meus pais Absolon Sobrinho e Maria
Lúcia pelo apoio, amor e generosidade.*

*Aos meus filhos Absolon Neto e Julianne que
mesmo distante fisicamente estão sempre no meu coração.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de acreditar nos meus sonhos.

O meu orientador, Cesar Santana, por sempre me guiar, apoiar e incentivar.

O meu co-orientador, Marco A. Cremasco, pela confiança.

Aos meus pais, pelo apoio e amor, indispensáveis para esta conquista.

A minha eterna companheira, Roberta Belaz, pela ajuda, pelo carinho e atenção.

**Aos meus amigos da Pousada do Sol pelas agradáveis conversas durante o momento de
lazer.**

Aos amigos da UNICAMP, pela ajuda.

A banca examinadora da tese que contribuíram na lapidação deste trabalho tão primoroso.

Ao amigo Vinicius Veredas que sempre estava me incentivando e orientando.

A CAPES pelo financiamento.

RESUMO

O *o,p'*-diclorodifenildicloroetano (mitotano) é o único agente quimioterápico utilizado no tratamento de carcinoma adrenocortical (CAC), um raro tipo de tumor que, na maioria dos casos, é maligno. O CAC tem sido diagnosticado em crianças e adultos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde o seu índice de incidência é de 10 a 15 vezes maior que mundial. O mitotano é um fármaco quiral comercializado na sua forma racêmica. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* mostraram que os enantiômeros do mitotano apresentam perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes, motivando a obtenção dos enantiômeros puros para futuros estudos pré-clínicos. Neste trabalho, a separação dos enantiômeros do mitotano foi avaliada através da cromatografia em batelada convencional e também por um novo processo contínuo conhecido como Varicol®. O sistema contínuo utilizou seis colunas quirais preparadas com a fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm i.d.) e fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v). Estudos preliminares com emprego de uma única coluna foram necessários para iniciar os experimentos com o Varicol® e esses foram divididos em três etapas: (i) experimentos em condições analíticas (determinação da porosidade total e do leito; determinação das grandezas termodinâmicas e das constantes de Henry); (ii) experimentos em condições semipreparativa (estudo de sobrecarga e isotermas de adsorção) e (iii) simulação das condições operacionais do Varicol® no programa Help®. As determinações da porosidade total e do leito foram de 0,680 e 0,428, respectivamente, valores estes condizentes com os encontrados na literatura. Os experimentos realizados para determinar as grandezas termodinâmicas (ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0) de adsorção na separação dos enantiômeros demonstraram boa estabilidade da coluna quiral em estudo e esta também apresentou boa eficiência de separação com valores do número de pratos médios de 1600, para vazões entre 1,0 e 2,5 mL/min e temperatura de 25 °C. O processo contínuo apresentou uma produtividade de processamento de 1,18 kg de enantiômero/kg de fase estacionária.dia (kkd) para o S-(-) e de 0,72 kkd para o R-(+)-mitotano, com um consumo de solvente de 160 L/kg enantiômero, enquanto que com o processo em batelada, a produtividade foi de 0,29 kkd para o S-(-) e de 0,28 kkd para o R-(+)-mitotano, com consumo de solvente de 1000 L/kg enantiômero. Portanto, o processo contínuo se mostrou mais eficiente quando comparado ao processo em batelada, além de apresentar um menor consumo de solvente.

ABSTRACT

The *o*, *p'*-dichlorodiphenyldichloroethane (mitotane) is the only chemotherapeutic agent used in the treatment of patients with adrenocortical carcinoma (ACC), a rare type of tumor and, in most cases, malignant. ACC has been diagnosed in children and adults, especially in the Southern and Southeastern of Brazil, where its incidence is 10 to 15 times greater than worldwide. Mitotane is a chiral drug commercialized in its racemic form. *In vivo* and *in vitro* experiments showed different pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles for mitotane enantiomers, encouraging this work in obtaining the pure enantiomers for future preclinical studies. In this work the separation of the enantiomers of mitotane was evaluated by the use of conventional batch chromatography and a new process known as continuous Varicol®. The continuous system used six chiral columns containing amylose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) (10 x 1.0 cm i.d.) and 2-propanol/acetonitrile (75:25 v/v) as mobile phase. Preliminary studies were conducted by using a single in order to initialize the experiments with the Varicol® and they were divided into three stages: (i) experiments in analytical conditions (determination of porosity and bed; determination of thermodynamic properties and Henry's constant); (ii) experiments under semipreparative conditions (study of overload and adsorption isotherms) and (iii) simulation of the operational conditions of the Varicol® by the use of Help® program. The determination of total porosity and bed porosity were 0.680 and 0.428, respectively, and these values are in accordance with the previous report in the literature. The experiments performed to determine the thermodynamic adsorption parameters (ΔG^0 , ΔH^0 and ΔS^0) in the separation of the enantiomers of mitotane demonstrated good column stability and also good separation efficiency, with an average number of plates of 1600 for flow rates from 1.0 to 2.5 mL/min, at temperature of 25 °C. The continuous process showed a productivity of 1.18 kg of enantiomer/kg of stationary phase.day (kkd) for S-(-) and 0.72 kkd for R-(+)-mitotane, with a solvent consumption of 160 L/ kg enantiomer, while the batch process yield 0.29 and 0.28 kkd for S-(-) and R-(+)-mitotane, respectively, with a solvent consumption of 1000 L/kg enantiomer. Therefore, the continuous process showed to be more efficient when compared to the batch process, also presenting a lower solvent consumption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura química dos enantiômeros S e R mitotano respectivamente.....	5
Figura 2.2 - Estruturas de alguns derivados de celulose e amilose como fases estacionárias quirais. R- representa a fase estacionária de celulose ou amilose [42].	11
Figura 2.3 - Estrutura química dos polissacarídeos de amilose e celulose (adaptado de [44]).....	11
Figura 2.4 - Estrutura tridimensional dos polissacarídeos de amilose e celulose (adaptado de [44]).....	12
Figura 2.5 – Fases estacionárias quirais mais utilizadas (distribuição FEQs para ~ 2000 compostos racêmicos)[45].....	13
Figura 2.6 - Capacidade de saturação (mg de soluto/g de fase estacionária) adaptado de Francotte [52].....	13
Figura 2.7 - Análise das curvas de ruptura para uma mistura binária (adaptado de Nicoud e Seidel-Morgenstern ⁶¹).....	19
Figura 2.8 - Banda cromatográfica dos tempos de retenção das frentes de choques.	20
Figura 2.9 - Perfil de eluição de gato e tartaruga na pseudo-coluna cromatográfica. (Adaptado de Rajendran <i>et al.</i> [81]).	27
Figura 2.10 - Esquema de uma unidade de LMV com 4 seções. (Adaptado de Rajendran <i>et al.</i> [81]).....	27
Figura 2.11 - Processo de leito móvel simulado (LMS). (Adaptado de Rajendran <i>et al.</i> [81]).	29
Figura 2.12 - O Processo Varizona. (Adaptado de Ludemann-Hombourger <i>et al.</i> [16]).	31
Figura 2.13 - Esquema (a) representa um sistema de LMS com 6 colunas. Esquema (b) representa o princípio de operação do LMS e 4 sub-períodos do sistema Varicol®. (Adaptado de Wongso <i>et al.</i> ⁹²).....	33
Figura 2.14 - Exemplo de uma configuração do Varicol® com 6 colunas: mudança da linha sobre um período. (Adaptado de Ludemann-Hombourger <i>et al.</i> ¹⁷).....	34
Figura 3.1 - Estrutura química do 1,3,5-terc-butil-benzeno (TTBB).	40
Figura 3.2 - Estrutura química da fase estacionária quiral <i>tris</i> (3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose.	41
Figura 3.3 - Esquema do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.	42

Figura 3.4 - Imagem da unidade Micro-Varicol®. Sistema de cromatografia contínua em leito móvel com comprimento de zona variável.	43
Figura 3.5 - Diagrama da sequência de experimentos em uma única coluna.	44
Figura 3.6 - Estrutura química do poliestireno.....	47
Figura 3.7 - Janela de entrada de dados software Help® que se refere às medidas dos parâmetros da coluna e a injeção analítica.	52
Figura 3.8 - Janela de entrada e saída dos dados do software Help® que se refere às medidas de sobrecarga e os parâmetros da isoterma de adsorção.	53
Figura 3.9 - Curva dos tempos de retenção em função da quantidade injetada sobre condições de sobrecarga do software Help®.	54
Figura 3.10 - Quadro de entrada e saída de dados da eficiência da coluna e da queda de pressão do software Help®.	55
Figura 3.11 - Outros dados de entrada para o cálculo das vazões projetadas para as correntes no sistema Varicol®.	55
Figura 3.12 - Parâmetros projetados para o sistema Varicol®.	56
Figura 3.13 - Perfil interno de concentrações previsto teoricamente.	57
Figura 3.14 - Produção, produtividade e consumo de solventes calculados teoricamente pelo software Help®.....	57
Figura 4.1 - Cromatogramas da separação do mitotano na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm). Vazão de 2,0 mL/mim e $\lambda = 270$ nm. Utilizando como fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v).....	60
Figura 4.2 - Cromatogramas da separação do mitotano na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm). Vazão de 2,0 mL/mim e $\lambda = 270$ nm. Utilizando como fase móvel 2-propanol/metanol (60:40 v/v).....	60
Figura 4.3 - Cromatogramas para determinação de (+) e (-) mitotano no dicroísmo circular. Coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm i.d.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v); vazão: 2,0 mL/min; Vinj: 20 μ L e λ : 270nm.	62
Figura 4.4 - Curva do primeiro momento para o composto inerte TTBB a 25 °C.....	63
Figura 4.5 - Cromatogramas dos perfis de eluição para os enantiômeros do mitotano obtidos na fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose com diferentes temperaturas.	

Fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v), volume de injeção de 20 μ L, vazão de 1,0 mL/min e $\lambda=270$ nm.	66
Figura 4.6 - Curvas de van't Hoff para os enantiômeros do mitotano em fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose: (■) S-(-)-o,p'-DDD, (●) R-(+)-o,p'-DDD.....	67
Figura 4.7 - Tempos de retenção das frentes das ondas de choque obtidos a partir da 1ª derivada do cromatograma de sobrecarga do mitotano. Condições experimentais – fase móvel: 2-propanol/acetonitrila 75:25 (v/v); vazão de 2,0mL/min; $\lambda=280$ nm; Vinj: 200 μ L; T = 25 °C; fase estacionária: tris(3,5-dimetilfenilcarmato) de amilose.	73
Figura 4.8 - Perfil de eluição de sobrecarga dos enatiômeros do mitotano em diferentes concentrações. Fase móvel isopropanol/acetonitrila (75:25 v/v); vazão de 2 mL.min ⁻¹ ; $\lambda=280$ nm.	74
Figura 4.9 - Isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano em fase estacionária tris(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose a 25 °C e vazão de 2,00 mL/min obtidas com o programa Help®.....	78
Figura 4.10 - Cromatograma da separação em batelada dos enantiômeros do mitotano. Coluna: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10,0 x 1,0 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/Acetonitrila(75:25). Vazão: 2,5 mL/min; Volume de injeção: 200 μ L e $\lambda:280$ nm.	80
Figura 4.11 - Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do mitotano. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (25 x 0,46 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25). Vazão: 1,0 mL/min; Vinj: 20 μ L e $\lambda:270$ nm. (A) (\pm)-mitotano (C: 200 μ g/mL) (B) 1º enantiômero a eluir (C: 100 μ g/mL) e (C) 2º enantiômero a eluir (C: 100 μ g/mL).....	81
Figura 4.12 - Perfil de concentração simulado pelo programa Help®.	84
Figura 4.13 – Primeira expressão para calcular o período de retirada da amostra em cada posição do sistema Varicol®.	86
Figura 4.14 – Segunda expressão para calcular o período de retirada da amostra em cada posição do sistema Varicol.	86
Figura 4.15 - Expressão para calcular a posição da amostra correspondente ao LMV em t = 0. ...	86
Figura 4.16 - Perfil interno de concentração no sistema Varicol® obtido experimentalmente.	87
Figura 4.17 - Perfil interno de concentração dos enantiomeros do mitotano obtidos por simulação no Help® e experimentalmente na unidade Varicol®.....	88

Figura 4.18 - Perfil experimental de concentração dos enantiômeros no ciclo 55 lido pelo detectores de UV-VIS e polarímetro.....	90
Figura 4.19 - Pureza enantiomérica obtida pelo número de ciclos da execução experimental na cromatografia de leito móvel Varicol® . (●) Extrato / R-(+)-mitotano; (○) Refinado/S-(-)-mitotano.....	91
Figura 4.20 - Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do mitotano. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (25 x 0,46 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v)). Vazão: 1,0 mL/min; Vinj: 20 µL e λ:270nm. (A) (±)-mitotano (B) S-(-)-mitotano e (C) R-(+)-mitotano.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Exemplos de fármacos quirais e as principais atividades dos seus enantiômeros.	8
Tabela 2.2 - Cálculo do número médio de colunas em cada seção do Varicol® (Configuração do Varicol® descrito na. Adaptado de Ludemann-Hombourger et al. ¹⁷	34
Tabela 2.3 - Parâmetros chave para o projeto do processo cromatográfico.	38
Tabela 4.1 - Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos com a solução de mitotano em coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.	61
Tabela 4.2 - Fatores de retenção, seletividade e resolução dos enantiômeros do mitotano em diferentes temperaturas.	65
Tabela 4.3 - Grandezas termodinâmicas calculadas para os enantiômeros S-(-)-o,p'-DDD e R-(+)-o,p'-DDD.	68
Tabela 4.4 - Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) e vazão de 1 mL/mim.	69
Tabela 4.5 - Dados de eficiência obtidos na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose para o enantiômero S-(-)-mitotano em diferentes temperaturas e vazões.	71
Tabela 4.6 - Dados de eficiência obtidos na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) para o enantiômero R-(+)-mitotano em diferentes temperaturas e vazões.	71
Tabela 4.7 - O tempos de retenção das frentes das ondas de choque obtidos em condições de sobrecarga da coluna tris(3,5-dimeitilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0cm de d.i.), fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v), vazão de 2,0mL/min, $\lambda=280\text{nm}$ e V_{inj} : 200 μL . 75	
Tabela 4.8 - Parâmetros da isoterma obtidos na temperatura de 25 °C com o programa Help® a partir do modelo Langmuir competitiva modificada.	76
Tabela 4.9 - Resumo dos parâmetros obtidos na separação dos enantiômeros do mitotano em cromatografia de batelada.	82
Tabela 4.10 - Dados fornecidos por simulação no programa Help®.	83
Tabela 4.11 – Posições de retirada das amostras de acordo com o período do ciclo.	85
Tabela 4.12 - Condições operacionais otimizadas para o sistema Varicol®.	89
Tabela 4.13 - Resumo dos parâmetros obtidos na separação dos enantiômeros do mitotano em um sistema Varicol®.	93

NOMENCLATURA

H	Altura equivalente a um prato (cm)
q^*_i	Capacidade máxima de saturação do adsorvente
A	Coefficiente da equação de van Deemter
B	Coefficiente da equação de van Deemter
C	Coefficiente da equação de van Deemter
R^2	Coefficiente de determinação
L	Comprimento da coluna (cm)
c^F_i	Concentração de alimentação do componente i
c_i	Concentração do componente i na fase líquida ($i=1,2,\dots,n$) (g/L)
q_i	Concentração do soluto i na fase estacionária ($i=1,2,\dots,n$) (g/L)
c^l_i	Concentração inicial do componente i na coluna antes de pré-carregar
q^F_i	Concentração na fase sólida em equilíbrio com a concentração alimentada
q^l_i	Concentração na fase sólida inicial da coluna antes de pré-carregar
c^P_i	Concentração no platô intermediário para um componente i , i ($i=1,2,\dots,n$)
a	Constante de adsorção
K	Constante de equilíbrio de adsorção
H_{ei}	Constante de Henry para um componente i

k	Constante de proporcionalidade
R	Constante dos gases ideais ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
d_p	Diâmetro das partículas (μm)
ΔG^0	Energia livre de Gibbs (kJ/mol)
ΔS^0	Entalpia de adsorção (J/mol.K)
ΔH^0	Entalpia de adsorção (kJ/mol)
k_i	Fator de retenção para um componente i ($i=1, 2, \dots, n$)
x_i	Fração molar do solvente i
$w_{h,i}$	Largura do pico a meia altura do componente i ($i=1,2$) (min)
N	Número de pratos
G_{ij}	Parâmetro de interação
ΔP	Queda pressão no leito
R_s	Resolução
T	Temperatura (K)
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade (K)
T_i	Tempo da frente da onda de choque do componente i ($i=1,2, \dots, n$)
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do componente i ($i=1,2, \dots, n$) (min)
$t'_{R,i}$	Tempo de retenção do componente i ajustado ($i=1,2, \dots, n$) (min)
t_0	Tempo de retenção do composto não retido à fase estacionária (min)

t_{inerte}	Tempo de retenção do inerte (min)
$t_{R,i}^*$	Tempo de retenção hipotético para um componente i , i ($i=A,B\dots n$)
t_M	Tempo morto (min)
$\Delta(\Delta G^0)$	Variação da energia livre de Gibbs (kJ/mol)
$\Delta(\Delta H^0)$	Variação da entalpia de adsorção (kJ/mol)
Q	Vazão de fase móvel (mL/min)

LETRAS GREGAS

β_i	Constante de adsorção não linear do componente i , i ($i=1,2\dots n$)
λ_i	Constantes de adsorção linear para um componente i , i ($i=1,2\dots n$)
α	Fator de separação
ε_p	Porosidade da partícula
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
Φ	Razão entre o volume de fase estacionária pelo volume de fase móvel
μ	Velocidade superficial
η_m	Viscosidade do solvente na mistura
η_i	Viscosidade do solvente puro i

SIGLAS

TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
AF	Análise frontal
AFPC	Análise frontal por ponto característico
CAC	Carcinoma adrenocortical
CB	Cromatografia em batelada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DC	Dicroísmo circular
EPC	Eluição por ponto característico
FE	Fase estacionária
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
LMS	Leito móvel simulado
MP	Método de perturbação
MTBR	Método do tempo binário de retenção
TAC	Tumores adrenocorticais
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo.....	3
CAPÍTULO 2	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Mitotano e seu uso na terapia do câncer	5
2.2. Fármacos Quirais	7
2.3. Separação de Enantiômeros	9
2.4. Modelos de Isotermas de Adsorção	14
2.4.1. Isoterma linear	14
2.4.2. Isoterma de Langmuir	14
2.4.3. Isoterma de Langmuir competitiva	15
2.4.4. Isoterma de Langmuir competitiva modificada	16
2.5. Métodos de determinação das isotermas	17
2.6. Influência da viscosidade sobre a composição da fase móvel	21
2.7. Grandezas termodinâmicas	23
2.8. Processo preparativo para separação de enantiômeros	26
2.9. Apresentação do Varizona e o processo Varicol®	31
2.9.1. Projeto das condições operacionais do processo Varicol®	35
CAPÍTULO 3	40
3. MATERIAIS E MÉTODO	40
3.1. Mitotano	40

3.2.Traçador	40
3.3.Fase Estacionária	40
3.4.Fase Móvel	41
3.5.Equipamentos	41
3.6.Obtenção dos dados de entrada para Software Help®	43
3.7.Experimentos em condições analíticas	44
3.7.1.Desenvolvimento de método analítico para separação dos enantiômeros do mitotano	44
3.7.2.Determinação das porosidades total e do leito	45
3.7.3.Determinação das grandezas termodinâmicas	47
3.7.4.Determinação das constantes de Henry	48
3.7.5.Determinação da eficiência da coluna ou número de pratos	49
3.7.6.Obtenção das curvas de calibração	49
3.7.7.Determinação da queda de pressão	50
3.8.Experimentos em condições semi-preparativa	50
3.8.1.Determinação dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque	50
3.8.2.Determinação das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal	51
3.9.Sequência de inserção dos dados no Software Help® para simular as condições operacionais do Varicol®	52
3.10.Separação dos enantiômeros por cromatografia em batelada	58
3.11.Separação dos enantiômeros por cromatográfica continua (Varicol®)	58
CAPÍTULO 4	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1.Experimentos em condições analíticas	59

4.1.1.Desenvolvimento de método analítico para separação dos enantiômeros do mitotano	59
4.1.2.Determinação das porosidades total e do leito	62
4.1.2.1.Determinação da porosidade do leito	64
4.1.3.Grandezas termodinâmicas.....	65
4.1.4.Determinação das constantes de Henry	68
4.1.5.Eficiência de separação da coluna	70
4.2.Experimentos em condições semi-preparativas	72
4.2.1.Obtenção dos tempos das frentes das ondas de choque	72
4.2.2.Determinação da isoterma pelo método dos tempos binários de retenção	75
4.3.Separação dos enantiômeros do mitotano	79
4.3.1.Separação por cromatografia em batelada	79
4.3.2.Separação por cromatografia contínua (Varicol®).....	82
CAPÍTULO 5	94
5.CONCLUSÕES.....	94
CAPÍTULO 6	96
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma adrenocortical (CAC), um raro tipo de tumor e na maioria dos casos maligno, tem acometido crianças e adultos principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil ¹.

Estudo realizado por Sandrini *et al.* ² estimou que o tumor adrenocortical acomete crianças numa incidência de aproximadamente 10 a 15 vezes maior na região sul do Brasil quando comparado com a incidência mundial.

Segundo Libè *et al.* ³ o CAC apresenta taxa de sobrevivência baixa, menos de 50% dos pacientes sobrevivem cinco anos após seu diagnóstico, sendo então importante a compreensão histopatológica, bem como o uso de agentes quimioterápicos eficazes. Para o tratamento do CAC o único agente específico disponível no mercado é o o,p'-diclorodifenildicloroetano, o qual é um metabólito do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). O o,p'-diclorodifenildicloroetano provou ser tóxico a tecidos específicos no córtex adrenal e a partir desta descoberta foi que este passou a ser utilizado como fármaco quimioterápico no tratamento do carcinoma adrenocortical (CAC), sendo hoje comercialmente conhecido como mitotano ou Lisodren® ⁴ que é comercializado pela Bristol-Myers Squibb®. Este fármaco é um agente antineoplásico utilizado em pacientes que não podem ser tratados cirurgicamente ou cujo câncer deu origem a uma metástase ⁵.

O mitotano por exercer um efeito citotóxico nas células adrenocorticais, que degenera os tecidos da zona fascicular e, particularmente, na zona reticular, enquanto que as alterações na zona dos glomérulos são relativamente reduzidas ⁶, torna-se o único agente antineoplásico para o tratamento do CAC.

Segundo a prescrição, o tratamento com mitotano deve se iniciar com pequenas doses diárias de 2 a 6 g divididas em 3 a 4 doses administradas ao longo do dia e aumentar gradativamente as doses até 9 a 10 g. Relatos da literatura indicam que o mitotano exerce sua ação antitumoral em concentrações plasmáticas entre 14 e 20 µg/L ⁷⁻⁹. No entanto altas doses do

mitotano são necessárias para atingir sua eficácia, causando na maioria dos pacientes efeitos colaterais intensos e frequentes, incluindo lesão temporária ou permanente da adrenal contralateral, ginecomastia, artralgia, erupção cutânea, náuseas, vômitos, diarreia e sintomas neurológicos como letargia, sonolência, mudança do humor e, mais raramente, coma¹⁰.

O mitotano possui um centro estereogênico, apresentando-se como uma mistura racêmica, que possui os dois enantiômeros puros em concentrações equimolares.

Um estudo *in vitro* realizado por Asp *et al.*¹¹ com células da linhagem H295R e com os enantiômeros puros do mitotano verificou diferenças significativas para viabilidade celular/citotoxicidade, bem como para secreção hormonal nas células alvo.

Devido às diferenças apresentadas pelos dois enantiômeros do mitotano em estudo *in vitro*, a separação dos enantiômeros do mitotano, em escala preparativa, é importante para realizar estudos pré-clínicos mais aprofundados, visto que os estudos que se referem à farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros ainda não foram bem esclarecidos. No entanto, acredita-se que a dose deste fármaco opticamente puro possa ser reduzida e, além disso, tratar com maior eficácia o CAC, além de reduzir seus efeitos adversos causados pela administração da mistura racêmica.

Cada vez mais tem se buscado desenvolver métodos para a separação e purificação de fármacos quirais, como é o caso do mitotano. Atualmente várias técnicas para a separação de enantiômeros em escala de grama têm sido utilizadas, por exemplo, rotas sintéticas, enantiosseletivas, a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia com fluido supercrítico (CFC), a eletroforese capilar (EC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

CLAE preparativa é o processo mais amplamente empregado para a separação, isolamento e purificação de enantiômeros por fazer uso de fases estacionárias quirais (FEQs) que apresentam elevada seletividade para a obtenção de enantiômeros opticamente puros e, além disso, permite separar diretamente os enantiômeros, sem necessidade de derivatização com reagentes quirais¹².

Um método empregado em cromatografia preparativa é o processo em batelada (descontínuo), isto é, uma quantidade da mistura é injetada em uma fase estacionária periodicamente e sob uma fase líquida, o qual escoar através da fase estacionária. Outro método

empregado é utilização da cromatografia líquida contínua em contracorrente, a qual permite alcançar altos rendimentos e produtividade elevada diante do processo de cromatografia em batelada. O processo de cromatografia contínua em contracorrente advém do primeiro processo de adsorção em contracorrente conhecido como processo Hypersorption, desenvolvido pela Union Oil Co. (Estados Unidos), para a purificação de hidrocarbonetos. Em 1961, Broughton e Gerhold ¹³ idealizaram o sistema conhecido como Leito Móvel Simulado (“Simulated Moving Bed – SMB”) ¹⁴, o qual se refere a um processo de separação contínua que consiste no arranjo de colunas de leito fixo conectadas em série. Neste arranjo ocorre um contato em contracorrente entre as fases sólida (adsorvente) e líquida (dessorvente), em que as posições das linhas de entrada (eluente e alimentação) e saída (refinado e extrato) mudam periodicamente a partir da movimentação das válvulas na direção da fase líquida ¹⁵.

Contudo, o leito móvel simulado (LMS) possui alto custo e em uma escala industrial requerem uma cuidadosa otimização das condições de operação com respeito às taxas de produção, recuperação e custo de separação ¹⁶.

Diante das dificuldades de otimização das condições de operação em escala industrial e laboratorial foi apresentado recentemente um processo de cromatografia contínua chamado de Varicol® idealizado a partir do leito móvel simulado (LMS).

A diferença básica entre os dois processos está no tempo de troca das posições de entrada e saída, em que para o LMS a troca é realizada por um período sincronizado, enquanto no sistema Varicol® a troca é assíncrona. Assim sendo, este último sistema fornece uma variação no comprimento da seção, o qual o número de colunas em cada seção envolvida é um valor não inteiro ¹⁷.

1.1. Objetivo

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal promover a separação dos enantiômeros do mitotano em escala preparativa empregando um sistema de cromatografia contínua conhecido como Varicol® composto por colunas cromatográficas empacotadas com

fase estacionária quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Para se alcançar esse objetivo foram traçadas as seguintes etapas:

Obtenção e avaliação dos parâmetros termodinâmicos de separação;

Determinação da porosidade total e do leito na fase estacionária para obtenção dos coeficientes de Henry;

Avaliação do perfil de sobrecarga da coluna com diferentes massas inseridas no leito empacotado;

Obtenção das isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano na fase estacionária quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose pelo método de análise frontal e o método do tempo binário de retenção (MTBR).

Utilizar o processo de cromatografia contínua de multicolunas ou processo Varicol®;

Comparar o consumo de solvente entre o processo de cromatografia em batelada e contínuo;

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mitotano e seu uso na terapia do câncer

Um dos metabólitos do DDT o o,p'-diclorodifenildicloroetano ou mitotano, (Figura 2.1), é o único medicamento utilizado como fármaco antineoplásico em pacientes que não podem ser tratados cirurgicamente ou cujo o carcinoma adrenocortical (CAC) deu origem a uma metástase ⁵.

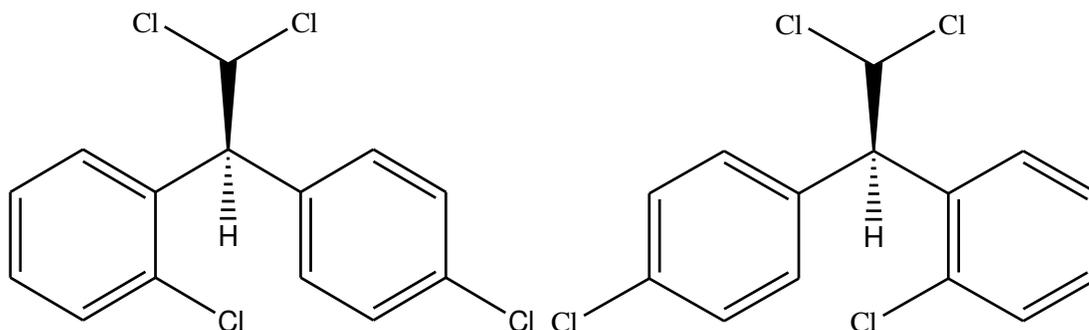


Figura 2.1 - Estrutura química dos enantiômeros S e R mitotano respectivamente.

O CAC é classificado como tumor epitelial. Ele é formado por células cúbicas, cilíndricas, ou planas, caracterizadas pela justaposição celular, não existindo qualquer tipo de substância intersticial ³. Segundo Parkin *et al.* ¹⁸, os tumores epiteliais não são comuns de serem encontrados em crianças abaixo de 5 anos de idade. Em um estudo realizado por Sandrini *et al.* ² estimou-se que o tumor adrenocortical acomete crianças em uma incidência de aproximadamente 10 a 15 vezes maior na região sul do Brasil quando comparado com a incidência mundial.

De acordo com The Manchester Children's Tumor Registry o índice mundial de CAC é de 0,38 casos por milhão em crianças menores que 15 anos de idade, dados constatados no período de 1954 a 1986. Nesse mesmo período, nos Estados Unidos os índices foram estimados em 0,30 casos por milhão em indivíduos menores que 20 anos; na França a estimativa chegou a 0,20 casos por milhão em crianças. Já no Brasil a estimativa foi de 2,8 a 3,0 casos por milhão, no período 1966 a 1996 ¹⁹.

Devido à raridade do CAC, o avanço no diagnóstico e tratamento dos tumores tem sido prejudicado pela grande heterogeneidade das apresentações clínicas e a baixa incidência destes tumores em países desenvolvidos ²⁰, em que menos de 50% dos pacientes sobrevivem cinco anos após o seu diagnóstico ³. A maioria dos pacientes que são submetidos à cirurgia tem reincidência e a única opção é uma terapia auxiliar com mitotano ²¹.

Ao longo dos anos, a terapia com mitotano tem sido exaustivamente debatida devido à sua toxicidade, a qual limita a adesão do paciente e, possivelmente, a sua eficácia, que requer altas doses do medicamento, além de não se ter um método adequado para determinar seus níveis em plasma ²². No entanto, com desenvolvimento de novos métodos de acompanhamento plasmático, foi possível demonstrar que a atividade do mitotano e sua toxicidade estão correlacionadas ²³.

O efeito mitotante sobre o córtex adrenal de seres humanos foi pela primeira vez estudado em 1959 por Bergenstal *et al.* ²⁴ e as implicações destes efeitos foram estudados por van Slooten *et al.* ²⁵, que categorizou as amostras de mitotano em soro, e verificou que os níveis de concentração abaixo de 14 mg/L são ineficazes e apenas acima desse valor apresentavam atividade terapêutica. Essa categorização foi confirmada por outros estudos, como o de Hough *et al.* ²⁶ e Hutter e Kayone ^{26,27} que demonstraram significativa melhora dos pacientes com níveis plasmáticos detectados acima de 14 mg/L ²⁸.

Atualmente o mitotano é comercializado e administrado na forma de racemato, ou seja, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros R-(+) e S-(-) ²⁹. Assim como ocorre com outros fármacos quirais diferenças farmacológicas entre os dois enantiômeros são necessárias de serem investigadas.

Asp *et al*¹¹ realizaram ensaios *in vitro* com os enantiômeros puros do mitotano em células tumorais humanas da linhagem H295R (adrenocortical) e as diferenças de atividade foram estatisticamente significativas. Os enantiômeros puros apresentaram maior efeito do que a mistura racêmica.

Cantillana *et al.*⁴ realizaram a administração de mitotano racêmico em cinco porcos e acompanharam sua farmacocinética por 180 dias de forma enantiosseletiva. Os resultados mostraram que o S-(-)-mitotano foi dominante em plasma de dois porcos, enquanto o R-(+) se mostrou dominante em três porcos.

Diante destas observações, que os enantiômeros do mitotano apresentam propriedades farmacocinéticas e farmacológicas diferentes, faz-se necessário o uso de uma técnica rápida, eficaz e com os menores custos possíveis para a separação dos enantiômeros do mitotano para que estes possam ser testados mais profundamente em estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Fármacos Quirais

Ao longo das décadas a estereosseletividade tornou-se imprescindível em farmacologia clínica. A caracterização de fármacos quirais está atraindo uma grande atenção dos órgãos de regulamentação e das indústrias farmacêuticas, visto que enantiômeros podem apresentar diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e na maioria dos casos estas diferenças estão associadas às distinções de potência e de atividade farmacológica no caminho que o medicamento percorre dentro do organismo humano, além de diferenças no metabolismo. O motivo que leva os enantiômeros a apresentarem essas diferenças em um sistema biológico está relacionado ao simples fato de que a maioria das reações catalisadas por enzimas são estereosseletivas³⁰⁻³².

Na década de 1960 um fato marcou a importância da quiralidade. A talidomida, um sedativo prescrito para mulheres grávidas para alívio de enjoos matinais, foi a responsável direta pelo nascimento de bebês com malformações congênitas. Os enantiômeros da talidomida

desempenham diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas; o enantiômero R-(+) é o responsável pelo efeito sedativo e seu enantiômero S-(-) está associado às deformidades físicas em recém-nascidos. Por conseguinte descobriu-se que ocorria uma conversão dos enantiômeros em ambiente *in vitro* e *in vivo*³³. Apesar de a talidomida ser a responsável pela maior tragédia ocorrida com um fármaco, e seu uso ser proibido em diversos países, ela ainda é utilizada no Brasil como medicamento no combate de doenças como hanseníase, AIDS, doenças crônico-degenerativas e mieloma múltiplo³⁴.

A Tabela 2.1 - Exemplos de fármacos quirais e as principais atividades dos seus enantiômeros. mostra alguns exemplos de fármacos quirais, que apesar de possuírem diferentes atividades farmacológicas do seus enantiômeros, ainda são utilizados como racematos.

Tabela 2.1 - Exemplos de fármacos quirais e as principais atividades dos seus enantiômeros.

Classe terapêutica	Fármaco	Características
Antiarrítmico	Disopiramida	O enantiômero S age diretamente na antiarrítmia, enquanto o R age de forma negativa na força de contração do coração ³⁵ .
β-Bloqueador	Propranolol	Atividade beta bloqueadora do enantiômero S é 100 vezes mais potente que o seu isômero R ³⁶ .
β-Adrenérgico	Salbutamol	A velocidade de metabolização do enantiômero R é muito maior que o enantiômero S ³⁷ .
Anti-inflamatório não-esteroidal	Ibuprofeno	No organismo humano o enantiômero R (inativo) se converte no enantiômero S (muito ativo) ³⁸ .
Diuréticos	Indacrinona	Efeito natriurético do enantiômero R>S; efeito uricosúricos do enantiômero S>R ³⁹ .

A justificativa dos fármacos ainda serem comercializados de forma racêmica reside em diversas dificuldades existentes na síntese dos enantiômeros puros, que na maioria delas envolvem várias etapas de reações, sendo inviável economicamente a sua separação⁴⁰. O desenvolvimento de novas técnicas na separação de racematos tem tornado o centro das atenções por indústrias farmacêuticas, agroquímicas e as indústrias de alimentos. Atualmente a técnica mais empregada na separação de racematos é a cromatografia líquida quiral.

2.3. Separação de Enantiômeros

A Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência (CLQAE) é a técnica mais amplamente utilizada para separação de enantiômeros, os quais podem ser separados pelo método direto ou indireto⁴¹⁻⁴³.

Pelo método indireto a mistura racêmica é primeiramente derivatizada com um reagente quiral opticamente puro, formando os respectivos diastereoisômeros, os quais apresentam propriedades termodinâmicas diferentes e podem ser separados em fases estacionárias aquirais. Este método apresenta a vantagem de se utilizar uma fase estacionária aquiral, porém as desvantagens de se precisar uma alta pureza do reagente quiral e necessitar fazer a conversão para obter os enantiômeros puros⁴¹⁻⁴³.

O método direto se baseia na separação direta dos enantiômeros em fases estacionárias quirais ou em aditivos quirais adicionados às fases móveis. Nesses casos não são necessárias à derivatização dos enantiômeros. O uso de aditivos na fase móvel torna o processo caro, além de apresentar problemas de separação e baixa seletividade. O método que emprega as fases estacionárias quirais (FEQs) apresenta várias vantagens. Entre elas pode-se citar: o grande número de fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente e as análises serem rápidas com os enantiômeros recuperados com relativa facilidade⁴¹⁻⁴³.

O mecanismo de separação enantiomérica por cromatografia utilizando fases estacionárias quirais está baseado na diferença de energia livre de Gibbs entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto.

O modelo proposto de reconhecimento quiral está baseado na teoria de interação de três pontos^{44,45}, ou seja, são necessários no mínimo três pontos de interação entre o enantiômero e o seletor quiral. Estas três interações devem ser simultâneas e devem ocorrer com três diferentes substituintes do centro estereogênico. Dependendo do número de interações existentes entre o seletor quiral e o enantiômero, há formação de dois complexos diastereoisoméricos intermediários com energia livre de Gibbs distintas. Esta diferença de energia determina o tempo de existência de cada complexo diastereoisomérico e a ordem de eluição de cada enantiômero, sendo aquele que forma o complexo menos estável, o qual elui primeiro. As interações que podem ocorrer entre o seletor quiral e o enantiômero são interações dipolo-dipolo, interações eletrônicas, pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals⁴³.

Dentre as fases estacionárias quirais, merecido destaque é dado às fases de polissacarídeos, em função da grande versatilidade que essas apresentam e por demonstrarem excelente discriminação quiral para uma extensa gama de compostos⁴⁶⁻⁴⁸.

Os polissacarídeos de maior aplicabilidade como fases estacionárias quirais são a amilose e a celulose, os quais são polímeros que apresentam atividades ópticas e são encontrados abundantemente na natureza, mas *in natura* apresentam limitada capacidade de separação quiral, propriedades mecânicas fracas, além de serem altamente polares^{33,42,43}.

Entretanto os polissacarídeos são facilmente convertidos em uma variedade de derivados, como acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamato, garantindo assim um maior número de sítios para o reconhecimento quiral. A Figura 2.2 ilustra alguns grupos presentes na maioria das fases estacionárias quirais.

A celulose e amilose são formadas por uma cadeia polimérica de unidades de glicose (D-(+) glicose); a amilose apresenta uma cadeia helicoidal e a celulose linear. A diferença entre as estruturas está no tipo de ligação formada, ou seja, a celulose apresenta na sua cadeia

polimérica ligações do tipo β -1-4, enquanto que a amilose, a cadeia polimérica é proveniente de ligações α -1-4 (Figura 2.3) ⁴⁹.

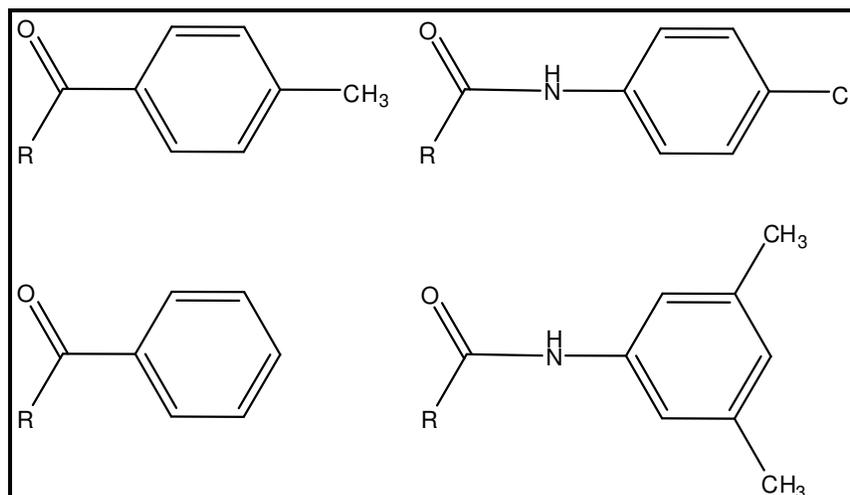


Figura 2.2 - Estruturas de alguns derivados de celulose e amilose como fases estacionárias quirais. R- representa a fase estacionária de celulose ou amilose [42].

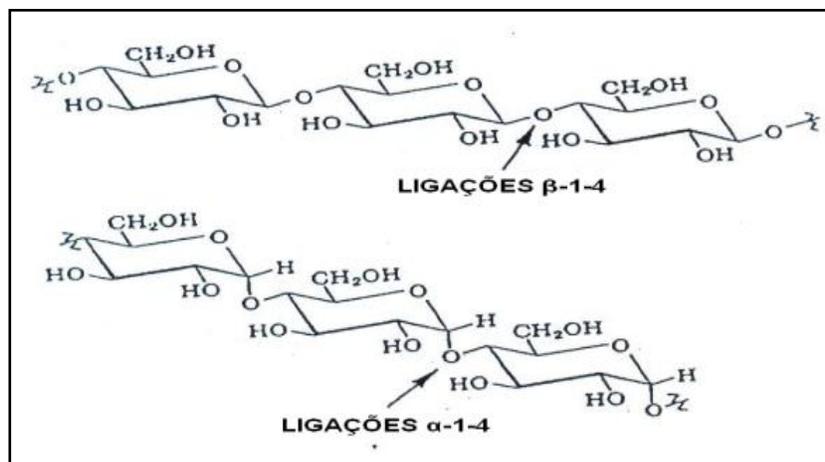


Figura 2.3 - Estrutura química dos polissacarídeos de amilose e celulose (adaptado de [44]).

Ambos os polissacarídeos possuem cavidades quirais, que são também responsáveis pela separação quiral. Essas cavidades formadas pela estrutura terciária são capazes de reter as moléculas estereosseletivamente (Figura 2.4)^{42,43}.

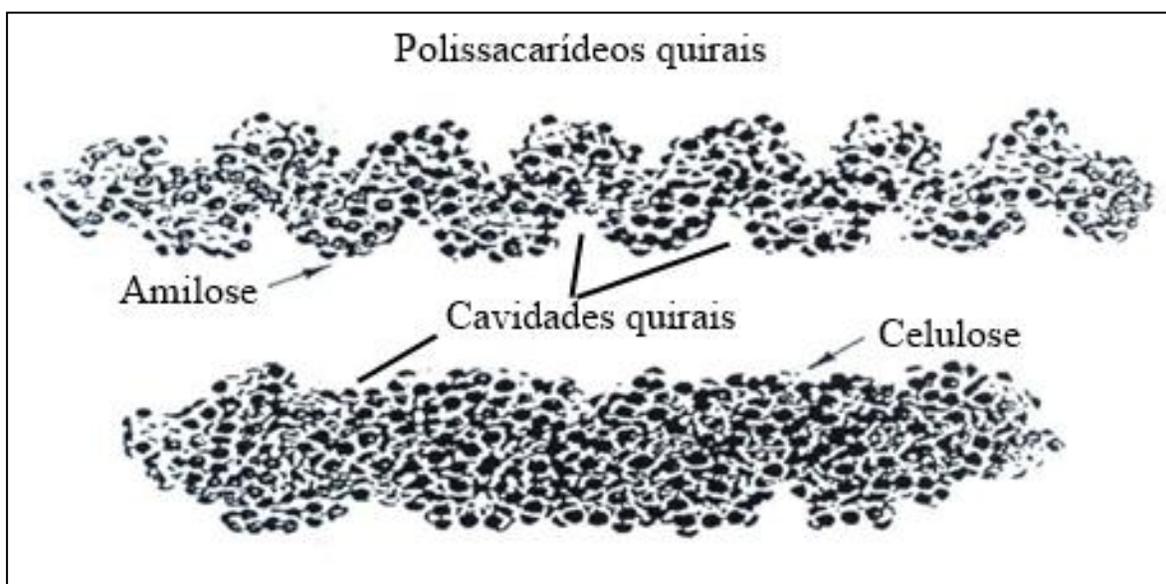


Figura 2.4 - Estrutura tridimensional dos polissacarídeos de amilose e celulose (adaptado de [44]).

Um estudo realizado por Francotte⁵⁰ mostrou a versatilidade e potencialidade das colunas de polissacarídeos; revisou cerca de 2000 separações de misturas racêmicas e que aproximadamente 90% delas foram enantiosseparadas por apenas quatro fases estacionárias quirais de polissacarídeos (Figura 2.5). Além disso, essas colunas apresentam um ótimo poder de saturação, aproximadamente 10-100 mg de soluto por g de fase estacionária, quando comparada com outras fases estacionárias quirais (Figura 2.6)⁵¹.

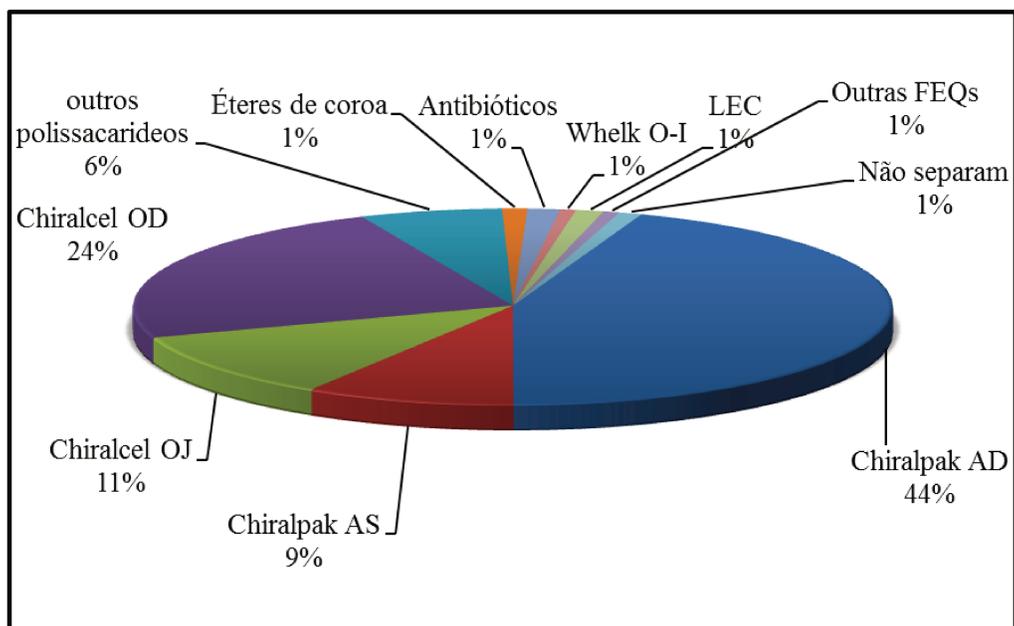


Figura 2.5 – Fases estacionárias quirais mais utilizadas (distribuição FEQs para ~ 2000 compostos racêmicos)[45].

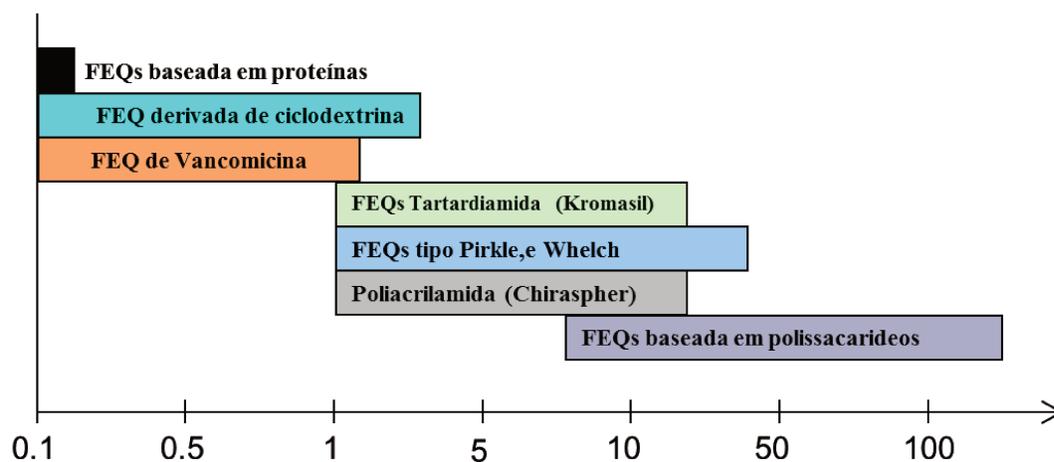


Figura 2.6 - Capacidade de saturação (mg de soluto/g de fase estacionária) adaptado de Francotte [52].

2.4. Modelos de Isotermas de Adsorção

2.4.1. Isoterma linear

A isoterma linear é amplamente utilizada na cromatografia analítica, pois as concentrações que a define são bastante diluídas.

Sendo assim, a isoterma que relaciona a concentração do soluto na fase estacionária, q_i , em equilíbrio com a concentração do soluto na fase móvel, c_i é calculada pela Equação 2.1:

$$q_i = H_{e,i} c_i = \left(k_i \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \right) c_i \quad (2.1)$$

em que, $H_{e,i}$ é a constante de adsorção de Henry para um componente i , k_i é o fator de retenção para um componente i ($k_i = t_R - t_0 / t_0$, com t_R , tempo de retenção, t_0 , tempo morto) e ε_T é a porosidade total da coluna.

2.4.2. Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir foi pela primeira vez descrita para explicar o comportamento da adsorção das moléculas de um gás sobre superfícies metálicas. A isoterma de adsorção de Langmuir tem sido aplicada com grande sucesso em muitos outros processos de adsorção reais, embora só explique o comportamento de adsorção em que envolve somente uma única espécie⁵².

O modelo da isoterma de Langmuir pressupõe que a adsorção é limitada a uma monocamada e os enantiômeros adsorvidos não interagem entre si e, no caso da ocorrência da

saturação dos sítios ativos da fase estacionária por um dos enantiômeros, não será dado lugar à adsorção da outra espécie ⁵².

A monocamada formada pode ser representada pela Equação 2.2:

$$q_i = \frac{q^* a c_i}{1 + a c_i} \quad i = A, B \quad (2.2)$$

e a sua expressão linear é dada pela Equação 2.3:

$$\frac{c_i}{q_i} = \frac{1}{K} + \frac{a}{K} c_i \quad i = A, B \quad (2.3)$$

em que, K e a são constantes da isoterma para uma combinação particular entre o soluto e o solvente, enquanto, q^*a , é representado por K .

2.4.3. Isoterma de Langmuir competitiva

A isoterma de Langmuir competitiva pode descrever o comportamento de adsorção para uma mistura enantiomérica, em que a competitividade entre os dois enantiômeros está direcionada a um único tipo de sítio de adsorção. O modelo de isoterma que pressupõe este comportamento pode ser representado pela Equação 2.4⁵³:

$$q_i = \frac{q^* \beta_i c_i}{1 + \beta_A c_A + \beta_B c_B} \quad (2.4)$$

Esse tipo de isoterma apresenta duas importantes características, a primeira se caracteriza por um sistema de seletividade constante, ou seja, a seletividade é independente da concentração. Significa que a forte seletividade do componente A em relação a fraca seletividade do componente B pode ser calculada pela Equação 2.5⁵³.

$$\alpha_{AB} = \frac{\frac{q_A^* \beta_A c_A}{1 + \beta_A c_A + \beta_B c_B}}{\frac{q_B^* \beta_B c_B}{1 + \beta_A c_A + \beta_B c_B}} = \frac{q_A^* \beta_A}{q_B^* \beta_B} = \frac{q_A^* \beta_A}{c_A} = \frac{q_A^* \beta_A}{q_B^* \beta_B} \quad (2.5)$$

o qual $c_A = c_B$.

A segunda característica importante da isoterma Langmuir competitiva é quando c_A e c_B tende a zero a isoterma aproxima-se de uma isoterma linear como da Equação 2.1⁵³.

2.4.4. Isoterma de Langmuir competitiva modificada

A isoterma de Langmuir competitiva modificada é derivada da Equação 2.4 pela adição de um termo linear que é o mesmo para ambos os enantiômeros, o que resulta na Equação 2.6. No entanto, a seletividade para este modelo não é constante, como no caso do modelo anterior, mas será maior para qualquer valor da composição. É importante ressaltar que este modelo não leva em conta a saturação da fase estacionária por causa do termo linear divergente⁵⁴.

$$q_i = \lambda_i c_i + \frac{q_i^* \beta_i c_i}{1 + \beta_A c_A + \beta_B c_B} \quad (2.6)$$

em que, λ_i , q_i^* , q_i e β_i são as constantes de adsorção linear para um componente i , capacidade máxima de adsorção dos sítios enantiosseletivos (gramas de soluto por gramas de fase estacionária), concentração do soluto i para uma definida fase estacionária (gramas de soluto por gramas de fase estacionária) e a constante de adsorção não linear do componente i , respectivamente.

Este modelo de isoterma aproxima-se de uma isoterma linear quando a concentração de ambos os componentes presentes na mistura racêmica tende a zero, então a constante de Henry é a soma entre o coeficiente do primeiro termo e coeficiente do segundo termo (Equação 2.7). Além disso, a capacidade máxima de adsorção dos sítios enantiosseletivos para os dois enantiômeros presupoem que são iguais ($q_A^*=q_B^*$), enquanto que para a isoterma Langmuir competitiva não pode suportar esta condição^{53,55}.

$$H_{e,i} = \lambda_i + q_i^* \beta_i \quad (2.7)$$

2.5. Métodos de determinação das isotermas

O resultado de uma separação cromatográfica é fortemente dependente das isotermas de adsorção dos solutos, uma vez que estas ditam os fatores de separação e as capacidades de saturação⁵⁶.

Segundo Araújo *et al.*⁵⁷ a maioria das separações enantioméricas são realizadas sob condições não lineares e a determinação da isoterma de adsorção das espécies enantioméricas é de fundamental importância para os processos de separação cromatográfica.

Com o conhecimento da isoterma e o auxílio de uma simulação computacional podem-se obter os parâmetros ótimos necessários para a separação em sistema de cromatografia contínua, por exemplo, em leito móvel com comprimentos de zonas variáveis (Varicol®) e permitindo o aumento de escala^{55,57,58}. Assim, sem o conhecimento das isotermas de adsorção

dos componentes alimentados no sistema, torna-se impossível determinar as melhores condições de funcionamento para o processo de separação contínua ⁵⁷.

Para a determinação das isotermas em um sistema cromatográfico, vários métodos estão disponíveis, apesar de alguns deles só poderem ser aplicados para a determinação de isotermas de um único componente, sendo então, necessários os enantiômeros puros para tais determinações.

Para contornar essa situação os métodos mais frequentemente utilizados são a análise frontal (AF), análise frontal por ponto característico (AFPC), método de perturbação (MP) e eluição por ponto característico (EPC) que podem ser executados em sistemas com multicomponentes ^{16,52,55}.

Estes métodos podem ser agrupados em duas categorias. O método de pulso, como EPC e AFPC, em que os dados das isotermas são derivados dos perfis de eluição da injeção da solução em diferentes volumes. A segunda categoria é o método do platô, como a AF e MP, em que os dados da isoterma são derivados por experimentos por saturação da coluna cromatográfica com diferentes concentrações da solução. Os métodos de pulso consomem menos soluto do que os métodos de platô, uma vez que com métodos do platô a determinação de cada ponto da isoterma requer grandes quantidades de amostra e de solventes, além disso, um maior tempo despendido para cada experimento ^{57,59}.

O método mais aplicado para a determinação de isotermas é o de análise frontal devido a sua precisão e relativa simplicidade ⁶⁰. A determinação dos dados da isoterma de adsorção pode ser realizada por sucessivas mudanças nas concentrações de alimentação da coluna que resultam diferentes curvas de ruptura. As concentrações nos platôs intermediários formado a partir do processo de adsorção e de dessorção (c_i^P) e os tempos de retenção ($t_{R,1}$ e $t_{R,2}$) resultantes por procedimentos experimentais são usados nas Equações 2.8 e 2.9 ⁵², em que definem os pontos característicos destas equações (Figura 2.7).

$$t_{R,i}^* = t_{R,1} \frac{c_i^P - c_i^I}{c_i^F - c_i^I} + t_{R,2} \frac{c_i^F - c_i^P}{c_i^F - c_i^I} \quad i = A, B \quad (2.8)$$

$$q_i^F(c_i^F) = \frac{t_{R,i}^* - t_0}{t_0 \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t}} (c_i^P - c_i^l) + q_i^l \quad i = A, B \quad (2.9)$$

em que, $t_{R,i}^*$, c_i^l , c_i^F , q_i^F e q_i^l são o tempo de retenção hipotético para o caso em que a coluna tem a mesma capacidade de adsorção, concentração inicial na coluna antes de pré-carregar, concentração de alimentação, concentração na fase sólida em equilíbrio com a concentração alimentada e concentração na fase sólida inicial da coluna antes de pré-carregar, respectivamente para o componente i . ε_t e t_0 são a porosidade total e o tempo morto.

Os valores de c_i^l e q_i^l são iguais a zero somente nos platôs intermediários para um único componente e no processo de adsorção e dessorção c_B^P e c_A^P são iguais a zero, respectivamente

52

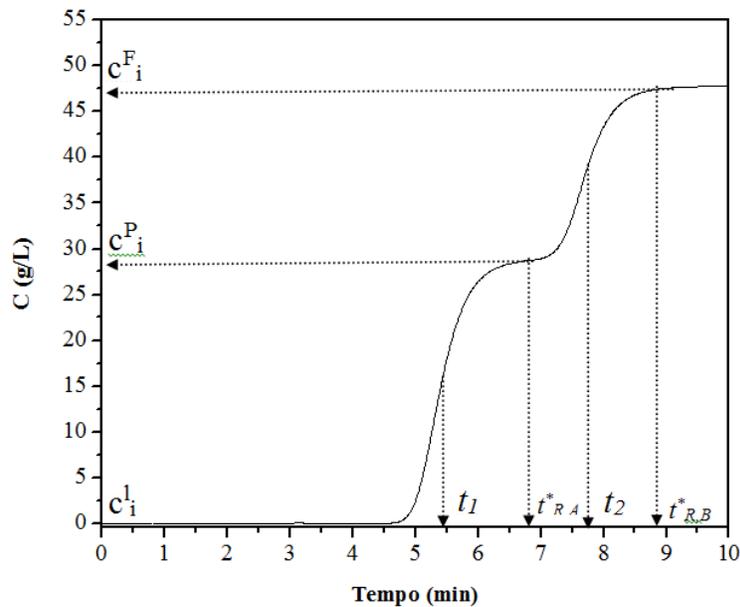


Figura 2.7 - Análise das curvas de ruptura para uma mistura binária (adaptado de Nicoud e Seidel-Morgenstern⁶¹).

Um método relativamente recente e que corresponde a um avanço do modelo do tempo de retenção desenvolvido por Golshan-Shirazi e Guiochon⁶² e que agora pode ser usado em misturas binárias é o método do tempo binário de retenção (MTBR)⁵⁹. Este método permite estimar os dados de equilíbrio da adsorção necessária para a concepção de separações no leito móvel simulado (LMS) e do leito móvel simulado com comprimento de zonas variáveis (Varicol®), muito mais rapidamente quando comparado com o método de pulso e de platô^{16,63,64}. O método baseia-se apenas nos tempos de retenção das duas frentes de choque resultantes da injeção do pulso de uma mistura binária (Figura 2.8), e das constantes de Henry, vistas anteriormente, que podem ser facilmente calculadas através da injeção de misturas de soluções diluídas (Equação 2.1). Uma vez que o MTBR foi desenvolvido para injeções de pulso de misturas binárias, que elimina a necessidade de preparar componentes puros, e, além disso, utiliza uma quantidade mínima do soluto⁵⁵. No entanto, este método só é utilizado quando há separação por linha de base.

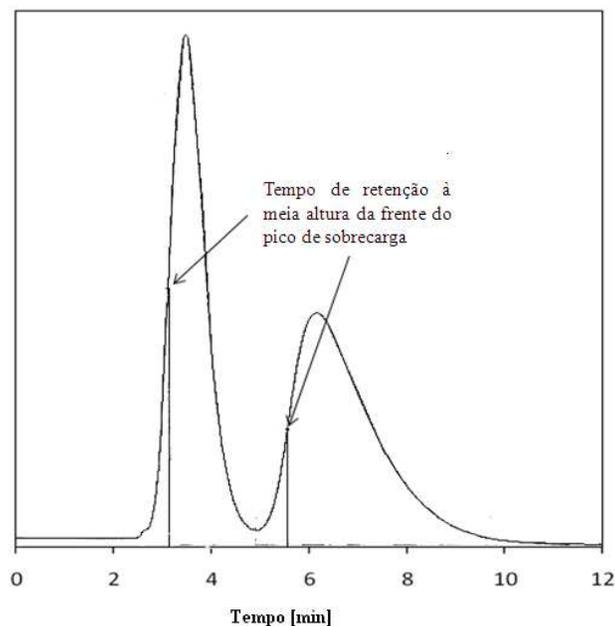


Figura 2.8 - Banda cromatográfica dos tempos de retenção das frentes de choques.

Rajendran *et al.*⁵⁹ descreveram que o método do tempo binário de retenção (MTBR) é usado estritamente para determinar os parâmetros de uma isoterma Langmuir competitiva e quando usado em sistema que não obedece a isoterma de Langmuir pode gerar parâmetros espúrios que não apresentam nenhum significado físico. No entanto, quando a isoterma é estabelecida por este método, significa que os parâmetros apresentarão uma boa concordância entre os parâmetros obtidos pelo método de análise frontal ou método inverso, ou seja, terá um desvio insignificante entre os parâmetros encontrados pelo método MTBR com os métodos de análise frontais ou inversos.

Os tempos de retenção das duas frentes de choque podem ser determinados pelo método do tempo binário de retenção generalizado (G-MTBR). Este método é aplicável em condições de sobrecarga, que pode ser utilizado para injeção de um volume constante de soluções com diferentes concentrações ou injeções de soluções com concentração constante fazendo-se o uso de diferentes volumes de injeção⁵⁹.

O estudo da sobrecarga da coluna determina a capacidade máxima de separação dos enantiômeros e auxilia na obtenção da isoterma não linear, fornecendo dados suficientes para determinar a produtividade máxima da coluna cromatográfica⁵¹. Um fator importante para o estudo da sobrecarga é a solubilidade máxima dos componentes na fase móvel, pois a escolha do método dependerá da solubilidade dos componentes e do tipo de coluna, seja analítica ou semi-preparativa.

2.6. Influência da viscosidade sobre a composição da fase móvel

A difusividade do soluto na fase móvel depende essencialmente da viscosidade, volume molar, massa molecular e da temperatura. Muitas correlações empíricas para calcular a difusividade utilizam estes parâmetros, por exemplo, a correlação de Wilke e Chang⁶⁵ e outras citadas por Guiochon⁶⁶.

A viscosidade de soluções concentradas pode ser bastante diferente quando comparada a de solventes puros. Há vários modelos para calcular a viscosidade destas soluções, embora a maioria revele a interpolação entre as viscosidades dos solventes puros envolvidos na mistura ⁶⁶.

De acordo com Guiochon ⁶⁶, para se realizar o cálculo da viscosidade de misturas de líquidos não aquosos com mais exatidão o método mais recomendado é a partir da equação de Grunberg-Nissan (Equação 2.10), em que a viscosidade é calculada para temperaturas baixas.

$$\ln \eta_m = \sum_i x_i \ln \eta_i + \sum_i \sum_j x_i x_j G_{ij} \quad (2.10)$$

sendo, η_i e η_m as viscosidades do solvente puro i e da mistura, respectivamente, x_i , a fração molar do solvente i . O parâmetro de interação, G_{ij} , é dependente da temperatura, normalmente dada a 20 °C independe da natureza do solvente puro i e j ($G_{ij} = 0$) e é somente utilizado para misturas binárias ⁶⁷. No entanto, na maioria dos casos o último termo da Equação 2.10 é ignorado, e esta equação torna-se idêntica a uma equação para misturas binárias proposta por Arrhenius em 1887 (Equação 2.11).

$$\ln \eta_m = x_1 \ln \eta_1 + x_2 \ln \eta_2 \quad (2.11)$$

O resultado obtido com a Equação 2.11 não contabiliza exatamente o valor da viscosidade de misturas binárias, mas revela uma excelente aproximação da dependência da viscosidade da fase móvel em diferentes composições ⁵².

2.7. Grandezas termodinâmicas

No que se refere ao argumento termodinâmico, torna-se imprescindível o conhecimento de grandezas termodinâmicas. Em se tratando da separação de enantiômeros por meio da técnica CLAE pelo método direto, fazendo-se uso de fases estacionárias quirais, é particularmente interessante o conhecimento da variação de entalpia padrão (ΔH^0), variação de entropia padrão (ΔS^0) e variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0) associados à adsorção na fase estacionária quiral. A análise de tais grandezas possibilita a compreensão dos mecanismos presentes na adsorção de cada um dos enantiômeros^{68,69}. Para tanto, toma-se como ponto de partida a Equação 2.12 que relaciona a variação da energia livre de um soluto quando é transferido de uma fase a outra em função de um coeficiente de partição.

$$RT \ln K = -\Delta G^0 \quad (2.12)$$

em que R é a constante universal dos gases; T , a temperatura absoluta; K , o coeficiente de distribuição relacionado a um sistema cromatográfico; ΔG^0 , variação de energia livre, a qual advém da Equação 2.13.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2.13)$$

sendo ΔH^0 a variação de entalpia padrão, e ΔS^0 a variação de entropia padrão. Substituindo a Equação 2.13 na Equação 2.12, tem-se a Equação 2.14.

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} \right) \quad (2.14)$$

O coeficiente de distribuição está relacionado ao fator de retenção pela razão entre o volume da fase móvel e o da fase estacionária. Desta forma rearranjando a Equação 2.14 e substituindo K pela expressão $k_i \frac{V_M}{V_S}$, obtém-se a Equação 2.15:

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi \quad (2.15)$$

na qual k_i é o fator de retenção para o enantiômero i ; V_M , volume da fase móvel; V_S , volume da fase estacionária; φ , razão entre as duas fases.

Segundo Peter *et al.*⁷⁰, a determinação de φ é relativamente fácil em cromatografia líquido-líquido com solventes puros, mas a situação é mais difícil em cromatografia de fase reversa com materiais ligados quimicamente.

Assumindo que ΔS^{0*} é a soma do segundo e terceiro termo da Equação 2.15, esta equação se torna mais simples como mostra a Equação 2.16⁷¹⁻⁷³.

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \Delta S^{0*} \quad (2.16)$$

A curva resultante da Equação 2.16, $\ln k_i$ versus $1/T$, é denominada curva van't Hoff, e ao se apresentar no formato linear mostra que a conformação da FEQ é rígida. Além disso, as características lineares da curva van't Hoff sugerem que as grandezas termodinâmicas ΔH^0 e ΔS^0 são independentes da temperatura⁷⁴.

Deve-se ressaltar que para obter mais informações a respeito do mecanismo de adsorção é importante verificar as diferenças das grandezas termodinâmicas $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ entre os

enantiômeros, uma vez que o processo de separação é caracterizado a partir destes dados, que resulta na diferença de energia livre de adsorção dos enantiômeros $\Delta(\Delta G^0)$. Esta diferença pode ser calculada a partir da curva $\ln \alpha$ versus $1/T$, a qual advém da Equação 2.17:

$$\Delta(\Delta G^0) = \Delta(\Delta H^0) - T\Delta(\Delta S^0) = \ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^0)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R} \quad (2.17)$$

em que $\Delta(\Delta G^0)$, $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ representam a diferença de energia livre Gibbs entre o seletor quiral e os enantiômeros de uma mistura racêmica, diferença entre a variação de entalpia padrão dos enantiômeros e a diferença entre a variação de entropia padrão dos enantiômeros, respectivamente, enquanto α significa o fator de separação.

Na cromatografia líquida quiral (CLQ) a enantioseparação é mais influenciada pelo termo entálpico ($\Delta(\Delta H^0)$) frente ao termo entrópico ($T\Delta(\Delta S^0)$), devido às baixas temperaturas utilizadas. Em temperaturas elevadas o termo entrópico pode alcançar o mesmo valor do termo entálpico, que resulta em um $\Delta(\Delta G^0)$ igual à zero ⁷⁵. Nesta condição deriva uma temperatura chamada de temperatura isoenantiosseletiva, (T_{iso}). Este valor pode ser predito pela Equação 2.18.

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H^0}{\Delta\Delta S^0} \quad (2.18)$$

Em temperaturas maiores que a T_{iso} ocorre uma inversão na ordem de eluição dos enantiômeros; normalmente as faixas de temperaturas estudadas estão abaixo da T_{iso} que são em geral valores superiores a 50 °C ⁷⁶. Os processos de separação de enantiômeros por cromatografia líquida quiral são conduzidos em temperaturas abaixo de 50°C, devido a perdas dos seletos quirais em temperaturas mais elevadas. ^{70,71,73,77}.

2.8. Processo preparativo para separação de enantiômeros

Há varias décadas que a Food and Drug Administration (FDA) regulamenta as indústrias farmacêuticas e alimentícias americanas, aplicando restrições às indústrias farmacêuticas que produzem enantiômeros puros. Estas indústrias devem obedecer a um procedimento de fabricação e controle adequado para assegurar que a composição estereoisomérica do produto esteja dentro das especificações desejadas, como a identificação, a atividade, a qualidade e a pureza do fármaco ⁷⁸. Devido às restrições dadas pela FDA, a tendência em desenvolver separações por cromatografia líquida preparativa está sendo frequentemente projetada com o objetivo de obter compostos com purezas cada vez mais elevadas ⁷⁹. Neste contexto, as separações cromatográficas de fármacos quirais envolvem no mínimo dois modos principais de purificação: processo de cromatografia em batelada e o processo de cromatografia contínua ⁸⁰.

A maioria dos processos de separação de enantiômeros é realizada por cromatografia em batelada. Isto é comprovado em levantamento realizado em setembro de 2012 na web of science com as três palavras chaves: “chiral”, “simulate moving bed” e “elution chromatography”, onde foram encontrados 271 trabalhos para as palavras “chiral” e “simulate moving bed” e 827 trabalhos para as palavras “chiral” e “elution chromatography”

A cromatografia em batelada é mais simples e muito utilizada quando são necessárias quantidades a partir de 1mg até cerca de 100g de enantiômeros puros. Quando se requer quantidades superiores, que podem chegar a algumas centenas de gramas até quilogramas, recorre-se ao sistema de cromatografia contínua ^{81,82}.

A separação em batelada pode ser alcançada pela injeção da solução de uma mistura binária dentro da corrente da fase móvel que flui através de uma coluna cromatográfica recheada com uma fase estacionária adequada. A cromatografia em batelada pode ser ilustrada usando uma analogia como na Figura 2.9, em que um grupo de gatos corresponde ao enantiômero menos retido e o grupo de tartarugas representa o enantiômero mais retido. A analogia mostra um perfil de eluição dos gatos e da tartarugas em uma pseudo-coluna cromatográfica ⁵⁵.

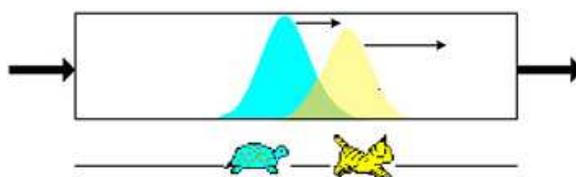


Figura 2.9 - Perfil de eluição de gato e tartaruga na pseudo-coluna cromatográfica. (Adaptado de Rajendran *et al.* [81]).

O processo de cromatografia contínua pode ser implementado através da unidade de leito móvel verdadeiro (LMV). O esquema do sistema de LMV com quatro seções, que corresponde ao arranjo mais comum empregado na separação de uma mistura binária, que é alimentada continuamente entre as seções 2 e 3 é ilustrado na Figura 2.10. Nesta figura considera-se que a mistura binária alimentada é composta pelos enantiômeros A e B e que o enantiômero mais fortemente retido (A) é recuperado na corrente de extrato, e o enantiômero menos retido (B) é retirado na corrente de refinado. Os fluxos das fases sólida e líquida se movimentam em direções contrárias e as duas passam por uma recirculação. São as correntes de entrada (eluente e alimentação) e saída (extrato e refinado) que dividem a unidade em quatro seções diferentes (1, 2, 3, 4), cada qual atuando com uma função específica⁸³.

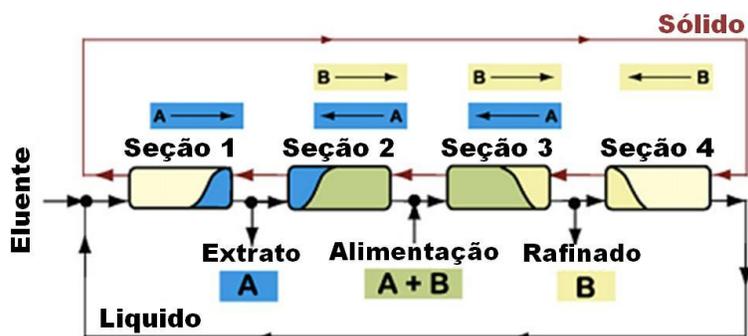


Figura 2.10 - Esquema de uma unidade de LMV com 4 seções. (Adaptado de Rajendran *et al.*[81]).

De acordo com a Figura 2.10, na seção 1 que se encontra entre a corrente de eluente e extrato ocorre a regeneração da fase sólida, devido a dessorção do composto A, o mais fortemente retido que é retirado na corrente extrato. Entre a seção 2 e 3 é realizada a alimentação da mistura A + B. Na seção 2 é promovida a dessorção do composto mais retido (A) e este é arrastado pela fase sólida em direção a seção 1. Na seção 3 é promovida a dessorção do composto menos retido (B) e este é arrastado pela fase líquida em direção a seção 4. Na seção 4, a fase sólida advinda da seção 1 regenera o eluente que sai da seção 3 que é recirculado para seção 1 isento dos enantiômeros A e B ¹⁵.

Para o LMV atingir a função desejada, o fluxo líquido de A deve estar no mesmo sentido da fase líquida na seção 1 e no sentido da fase sólida, na seção 3, ao contrário do enantiômero B que deve estar no sentido da fase líquida entrando na seção 2 e no sentido da fase adsorvente na seção 4. Então, o sucesso deste processo de separação dependerá da escolha adequada das condições de operação, principalmente das vazões de fluido e sólido em cada uma das seções, que precisam obedecer a certas restrições ⁵⁵.

O processo de leito móvel verdadeiro possui algumas vantagens comparadas à cromatografia em batelada (CB). Primeiro, no processo LMV, elevados desempenhos podem ser alcançados mesmo com valores de seletividades bastante baixos e com um número de pratos teóricos relativamente pequenos ⁸⁴. Significa que, ao contrário da CB, o LMV permite a sobreposição dos perfis de concentração ao longo do leito de adsorção, em que os componentes puros são coletados nos locais de extrato e de refinado, permitindo sua operação em condições de sobrecarga de concentração ⁵³. A segunda vantagem do LMV sobre a CB está associada ao processamento contínuo de alimentação, uma vez que, depois de atingido um regime contínuo permite reduzir o consumo de solvente e melhorar a produtividade por unidade de tempo, além de aumentar a recuperação dos componentes por unidade de massa de fase estacionária utilizada ⁸⁴.

A principal desvantagem do processo de leito móvel verdadeiro está associada com o movimento da fase sólida adsorvente, pois a complexidade mecânica do equipamento e o atrito das partículas com as paredes da coluna dificultam o projeto de tal processo ⁵⁵, ou seja, este processo na realidade não existe, mais é virtualmente utilizado em simulações.

Broughton e Gerhold ¹³ da Universal Oil Products (EUA) na década de 1960 desenvolveram e patentearam o conceito de leito móvel simulado (LMS) que é uma implementação prática do processo de LMV. No processo de LMS, ilustrado na Figura 2.11, colunas de cromatografia convencionais de leito fixo, por exemplo, colunas com fases estacionárias quirais, podem ser utilizadas. O princípio que simula o movimento do leito ocorre de maneira que as portas de entrada e saída da unidade são trocadas de posição periodicamente na direção do escoamento fluido, de modo simular, de maneira descontínua, o movimento contínuo em contracorrente da fase sólida como o processo LMV ^{15,59,85}.

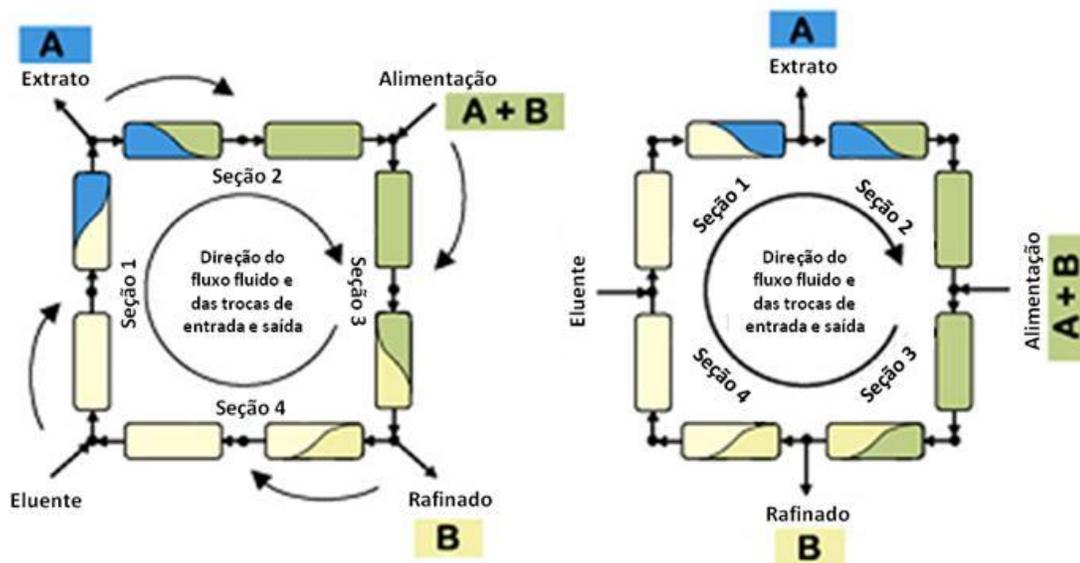


Figura 2.11 - Processo de leito móvel simulado (LMS). (Adaptado de Rajendran *et al.*[81]).

Na Figura 2.11 está esquematizado um leito móvel simulado com 8 colunas, cuja configuração é 2-2-2-2, ou seja, 2 colunas por seção. No entanto, esta configuração pode variar para cada sistema e não necessariamente apresentar o mesmo número de colunas por seção.

O processo de LMS foi originalmente desenvolvido para separar o n-hexano e ciclohexano a partir de sua mistura e logo depois foi aplicado na separação de soluções aquosas, por

exemplo, a separação da frutose/glicose⁸⁶. Somente mais tarde, na década de 1990 que surgiram as primeiras publicações que considerava o LMS para separação de enantiômeros. Após 10 anos de pesquisas experimentais de unidades de LMS para separações quirais, indústrias farmacêuticas e de química finas investiram na produção de compostos enantioméricos⁸⁷.

As técnicas de separação por LMS e CB, embora sejam distintas, algumas comparações gerais disponíveis que relacionam o desempenho da cromatografia batelada com o LMS, por exemplo, o estudo realizado por Strube *et al.*⁸⁸, que compara o desempenho da cromatografia em batelada com o LMS a partir da separação de frutose/glicose para uma produção em larga escala, e concluíram que a produtividade por batelada foi superior ao LMS em quase duas vezes, no entanto, o consumo de solvente no processo em batelada foi o dobro do exigido para o LMS. Neste caso o fator mais importante foi o custo do solvente que superou o custo da produtividade. Assim, o LMS torna-se muito mais vantajoso que o processo em batelada para a separação da frutose/glicose.

Outro estudo foi realizado por Peper *et al.*⁸⁹, que investigaram o custo de separação dos enantiômeros do ibuprofeno no processo em batelada e LMS em escala laboratorial por fluido supercrítico. Estes autores chegaram à conclusão que o processo em batelada, apesar de despender uma maior quantidade de solvente e energia, é mais econômico do que o processo em LMS por causa do alto custo das fases estacionárias não compensar o consumo do solvente e energia. Segundo os cálculos realizados para a produção de R/S-ibuprofeno com taxa de 0,4 tonelada/ano requer um investimento de €794/kg utilizando o processo em batelada e de €1417/kg utilizando o processo de LMS.

O principal fator que influencia nos resultados das separações sobre os diferentes custos e sobre os graus relativos do esforço na investigação da otimização dos diferentes processos comparados é a isoterma de adsorção⁵². Além disso, a combinação da cromatografia com um processo de separação complementar, como cristalização, oferece a possibilidade de melhorar o desempenho do processo⁷⁹.

O LMS surgiu para resolver os problemas da CB, problemas associados com a utilização eficiente do leito adsorvente, o consumo de solvente, a produtividade e o custo de produção,

porém ainda apresentava algumas limitações, por exemplo, o aumento da eficiência das colunas e a flexibilidade de operar o sistema com menor número de colunas.

Com o objetivo de obter maiores produtividades com baixo consumo de fase estacionária por unidade de massa dos enantiômeros purificados, um novo processo foi recentemente patenteado pela NovaSep chamado de Varicol® que ao contrário da clássica unidade de LMS, pode ser operado com no mínimo 3 colunas^{17,90}.

2.9. Apresentação do Varizona e o processo Varicol®

Segundo Ludemann-Hombourger *et al.*¹⁷ a ideia básica do processo de Varizona (Figura 2.12) é a modificação do LMV apresentado anteriormente, ou seja, o varizona é um processo virtual como o LMV. No entanto, neste processo permite variar o comprimento das zona ao longo do tempo. Ao contrário do que ocorre no processo LMV, em que o comprimento são fixas. Significa que o sistema varizona não é um processo estacionário, pois a velocidade da fase sólida não é constante em relação às linhas de entrada e saída do processo, ao contrário do LMV, na qual a velocidade permanece inalterada.

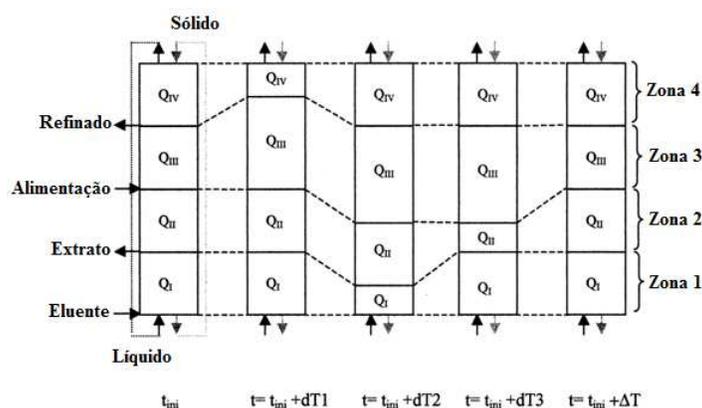


Figura 2.12 - O Processo Varizona. (Adaptado de Ludemann-Hombourger *et al.* [16]).

Devido às limitações do LMV, por exemplo, aumentar a eficiência das colunas, diminuir o consumo de solvente, aumentar a produtividade e diminuir o custo de produção foi implementado o varizona. Dentro deste contexto, foi criado o processo Varicol®, um sistema que é a implementação prática do Varizona.

O processo Varicol® pode ser operado na mesma unidade do LMS. Tanto o LMS e o processo Varicol® são constituídos por um número de colunas ligadas em ciclo com quatro correntes entre elas, duas de entrada (eluyente e alimentação) e duas de saídas (extrato e refinado)⁹¹. Além disso, o tempo de troca das correntes de entrada e saída está diretamente relacionado com a vazão de escoamento da fase sólida no LMS, sendo ele também um parâmetro chave no processo Varicol®, embora a relação não seja simples⁹². Os tempos de troca no processo Varicol® não são sincronizados, ao contrário do que ocorre no LMS em que a operação de troca é sincronizada⁸⁷. O processo Varicol® é um sistema cíclico. Um ciclo corresponde ao tempo requerido para cada linha de entrada e saída recuperar o seu estado inicial. Dentro do ciclo total, o Varicol® pode também exibir sub-períodos. Um período é o tempo requerido para todas as posições serem trocadas por uma coluna. A Figura 2.13 mostra a comparação entre o sistema Varicol® e o LMS.

Em um intervalo de tempo o Varicol® permite variar o número de colunas dentro das seções, enquanto que o LMS não permite tal variação, o que torna o Varicol® mais vantajoso em relação ao LMS devido a maior produtividade que pode ser alcançada com o mesmo número de colunas. Isto significa que o número médio de colunas em cada seção no Varicol® não é necessariamente um número inteiro, como ocorre com o LMS⁸⁷.

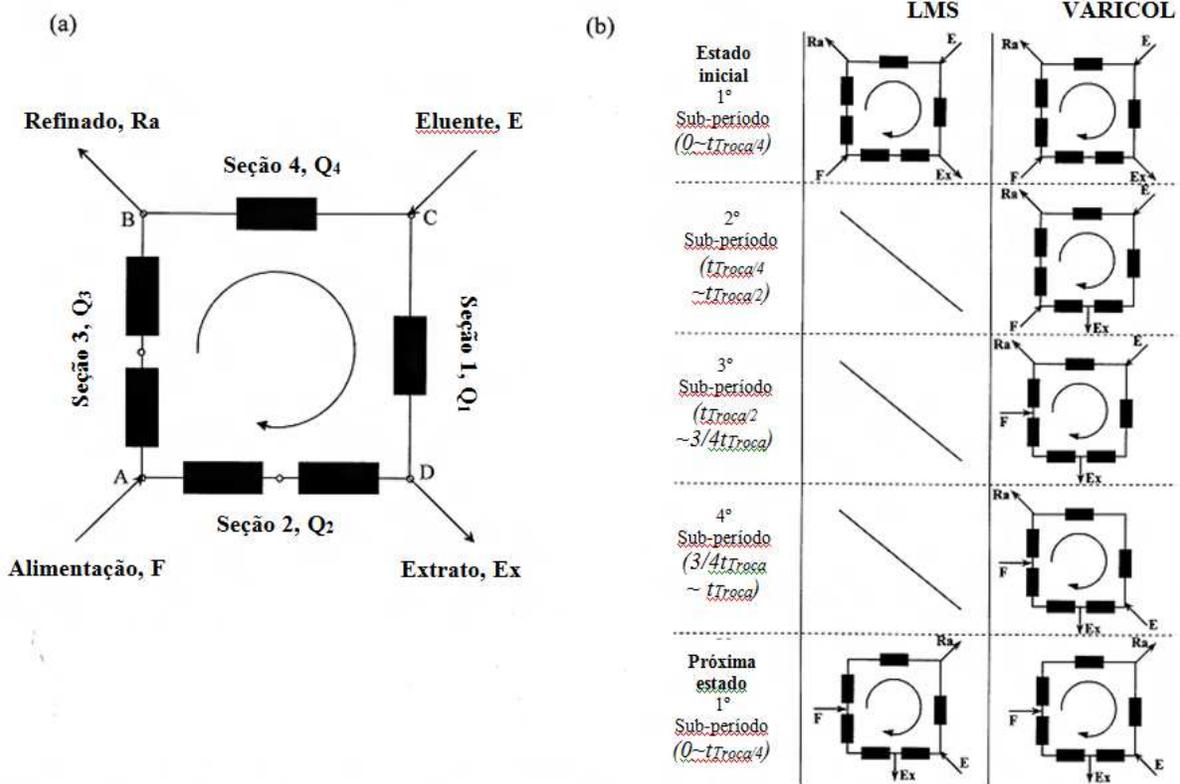


Figura 2.13 - Esquema (a) representa um sistema de LMS com 6 colunas. Esquema (b) representa o princípio de operação do LMS e 4 sub-períodos do sistema Varicol®. (Adaptado de Wongso *et al.* ⁹²).

A evolução do número de coluna por seção é ilustrada na Figura 2.14. Para esta configuração, pode-se calcular o número médio de colunas por seção durante um período completo. Na seção 1 o número de colunas é igual a 1 durante dois quartos do período e igual a 2 durante os outros dois quartos.

O número médio de colunas na seção 1 é:

$$N_{C_1} = 2 \times \frac{1}{4} \times 1 + 2 \times \frac{1}{4} \times 2 = 1,5 \text{ colunas}$$

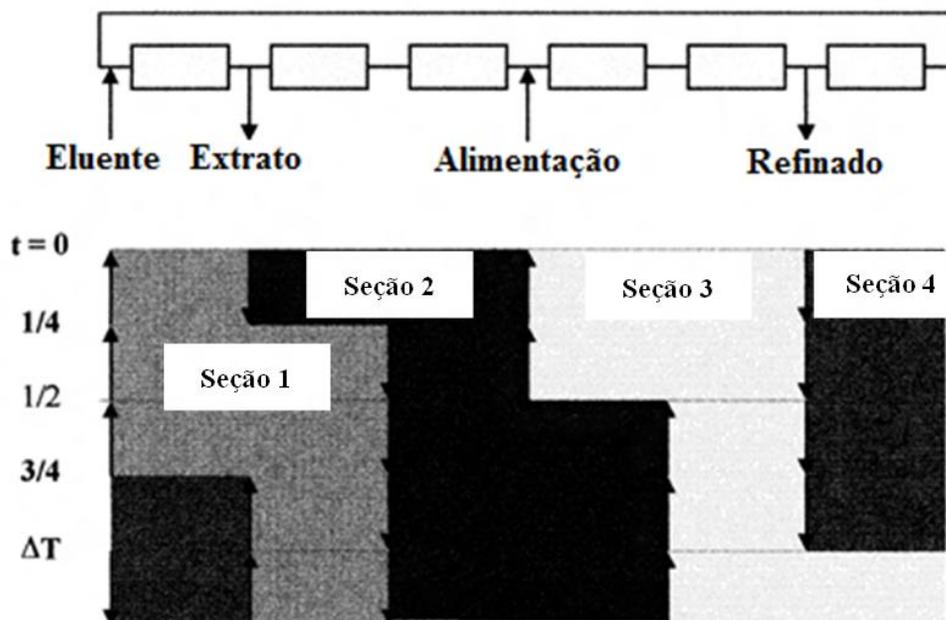


Figura 2.14 - Exemplo de uma configuração do Varicol® com 6 colunas: mudança da linha sobre um período. (Adaptado de Ludemann-Hombourger *et al.*¹⁷).

Os mesmos cálculos podem ser realizados nas três outras seções como descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Cálculo do número médio de colunas em cada seção do Varicol® (Configuração do Varicol® descrito na. Adaptado de Ludemann-Hombourger *et al.*¹⁷).

Fração do período	Duração	Número de colunas			
		Seção 1	Seção 2	Seção 3	Seção 4
0→1/4Δt	1/4Δt	1	2	2	1
1/4Δt→1/2Δt	1/4Δt	2	1	2	2
1/2Δt→3/4Δt	1/4Δt	2	2	1	1
3/4Δt→Δt	1/4Δt	1	2	1	2
Número médio de colunas		1,5	1,75	1,5	1,25

A determinação do número médio de colunas em cada seção do sistema Varicol® parece ser muito simples. No entanto é muito complexa a obtenção destes valores, pois necessita de um algoritmo específico que realize simulações numéricas adaptadas a modelagem deste sistema. Visto que, o processo Varicol® apresenta subperíodos de troca dentro do período de troca.

2.9.1. Projeto das condições operacionais do processo Varicol®

O cálculo das condições das vazões e o tempo de troca no processo Varicol®, devido à troca assíncrona, é bastante complexo não existindo nenhum método simples e alguns autores sugerem utilizar a mesma modelagem utilizada na identificação das condições de operação para o LMS^{55,92,93}.

As condições de operação do processo Varicol® são definidas a partir de três quesitos importantes: (i) determinar a vazão da bomba de alimentação que é definida a partir da taxa de produção, (ii) conhecer a isoterma de adsorção que nas separações de enantiômeros, por cromatografia líquida e (iii) assumir um modelo que possa quantificar os parâmetros do Varicol®. Wongso *et al.*⁹² sugerem que o melhor modelo para quantificar os parâmetros operacionais Varicol® é o modelo de mistura de células. Dentro deste contexto, a coluna é assumida como uma série de mistura de células ideais. O modelo contabiliza a cinética de transferência de massa e hidrodinâmica, que são caracterizadas pelo número de pratos teóricos. A equação do balanço de massa para o enantiômero i em uma célula de mistura k durante o N -ésimo período para o LMS é calculado pela Equação 2.19:

$$C_{i,k-1}^{(N)} = C_{i,k}^{(N)} + \left[\frac{t_0(\phi)}{J} \right] \frac{dC_{i,k}^{(N)}}{dt} + \left[\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right] \left[\frac{t_0(\phi)}{J} \right] \times \frac{d\bar{C}_{i,k}^{(N)}}{dt} \quad 0 \leq t \leq t_s \quad (2.19)$$

enquanto a equação do balanço de massa para o enantiômero i na célula de mistura k durante o M -ésimo subintervalo do N -ésimo período de troca para o Varicol® é calculado a partir da Equação 2.20:

$$C_{i,k-1}^{(N,M)} = C_{i,k}^{(N,M)} + \left[\frac{t_0(\phi)}{J} \right] \frac{dC_{i,k}^{(N,M)}}{dt} + \left[\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right] \left[\frac{t_0(\phi)}{J} \right] \times \frac{dq_{i,k}^{(N,M)}}{dt} \quad (2.20)$$

$$0 \leq t \leq t_s / 4; M = 1, 2, 3 \text{ ou } 4$$

em que C e q são as concentrações na fase móvel e na fase estacionária, respectivamente. J é o número teórico de células na coluna (ou número de pratos teóricos) e t_0 é o tempo de retenção zero da coluna na seção ϕ (1, 2, 3 ou 4) calculado a partir da Equação 2.21:

$$t_0(\phi) = \frac{\varepsilon V_{col}}{Q(\phi)} \quad (2.21)$$

em que $Q(\phi)$ é a vazão volumétrica dentro da coluna na seção ϕ , e, ε a porosidade do leito.

As condições de contorno têm de serem adequadas, devido ao regime periódico do processo, estas condições mudam com o tempo, de acordo com as posições das diferentes correntes de entrada e saída do sistema. A condição inicial para uma coluna vazia antes de inicializar o processo é dado pela Equação 2.22:

$$C_{i,k}^{(N=0)} = C_{i,k}^0 = 0 \quad (2.22)$$

Utiliza-se a teoria do nó ⁹² para encontrar as condições de contorno do balanço de massa na entrada de cada seção do LMS (ou Varicol®). Portanto, o balanço de massa na entrada da seção 1 é dado pela Equação 2.23:

$$C_{i,entrada}^{(N)} \Big|_{\phi=1} = \frac{(Q_1 - Q_D) C_{i,final}^{(N)} \Big|_{\phi=4}}{Q_1} \quad (2.23)$$

O balanço de massa no início da seção 2 quando a corrente de extrato é retirada no final da seção 1 é dado pela Equação 2.24:

$$C_{i,entrada}^{(N)} \Big|_{\phi=2} = C_{i,final}^{(N)} \Big|_{\phi=1} \quad (2.24)$$

A corrente de alimentação é injetada entre a entrada da seção 3 e a saída da seção 2, então o balanço de massa no início da seção 3 pode ser calculado pela Equação 2.25:

$$C_{i,entrada}^{(N)} \Big|_{\phi=3} = \frac{Q_2 C_{i,final}^{(N)} \Big|_{\phi=2} + Q_F C_i^F}{Q_3} \quad (2.25)$$

O balanço de massa para o refinado que entra da seção 4 quando é retirado no final da seção 3 é calculado a partir da Equação 2.26:

$$C_{i,final}^{(N)} \Big|_{\phi=4} = C_{i,entrada}^{(N)} \Big|_{\phi=3} \quad (2.26)$$

De acordo com Ludemann-Hombourger *et al.*¹⁷ os parâmetros relevantes para a otimização do processo Varicol®, como por exemplo, as vazões em cada seção e o tempo de troca do processo, são os listados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Parâmetros chave para o projeto do processo cromatográfico.

Parâmetros	Dimensão/expressão/unidades	
Dimensão da coluna	Diâmetro e comprimento do leito (cm)	(2.27)
Concentração da alimentação	$c_A = c_B$ (g/L)	(2.28)
Isoterma de adsorção	Isoterma de Langmuir competitiva modificada: $q_i = \lambda_i c_i + \frac{q^* \beta_i c_i}{1 + \beta_A c_A + \beta_B c_B}$ (g/L)	(2.29)
Queda de pressão/coluna	Lei de Darcy: $\frac{\Delta P}{L} = kv$ (SI)	(2.30)
Eficiência da coluna	Equação de van Deemter modificada: $H_i = \frac{L}{J} = A + Bv_i$ (SI)	(2.31)

Os parâmetros citados na Tabela 2.3, como a concentração de alimentação e a isoterma já foram mencionados anteriormente, pois é a partir da concentração de alimentação que a produção do processo Varicol® é projetada e a isoterma fornece a concentração de cada enantiômero na fase estacionária versus a concentração do enantiômero na fase móvel quando o equilíbrio é alcançado na temperatura estudada. Estes dois parâmetros são usados nas simulações numéricas do processo de cromatografia contínua ou Varicol®.

Pode se verificar que as expressões que calculam a queda de pressão e a eficiência em uma coluna são diretamente influenciadas pela velocidade da fase móvel. A hidrodinâmica da coluna é quantificada pela queda de pressão, pois os limites máximos das vazões em cada zona dependem das dimensões da coluna, do leito empacotado, da viscosidade da fase móvel, na qual

estes fatores influenciam diretamente na pressão que não pode ser ultrapassada para um adequado projeto das vazões do processo Varicol®. Já o cálculo da eficiência da coluna ou altura do prato teórico é usado para simular numericamente o processo e quantificar o alargamento da banda cromatográfica causado pelo enantiômero dentro da coluna.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Mitotano

O mitotano, comercializado como racemato, foi adquirido da Yick-Vik Chemicals and Pharmaceuticals (China) e apresenta massa molar de 320,04 g/gmol.

3.2. Traçador

O composto 1,3,5-terc-butil-benzeno (Figura 3.1) de massa molar de 246,44 g/gmol, conhecido como TTBB, foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA).

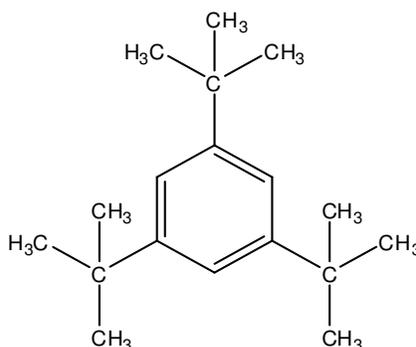


Figura 3.1 - Estrutura química do 1,3,5-terc-butil-benzeno (TTBB).

3.3. Fase Estacionária

Para as separações cromatográficas envolvendo misturas racêmicas utilizou-se coluna semi-preparativa de aço inox (10 x 1,0 cm) empacotadas com sílica, 20 µm, recoberta com seletor

quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, denominada comercialmente como Chiralpak® AD, da Chiral-Japão (Figura 3.2).

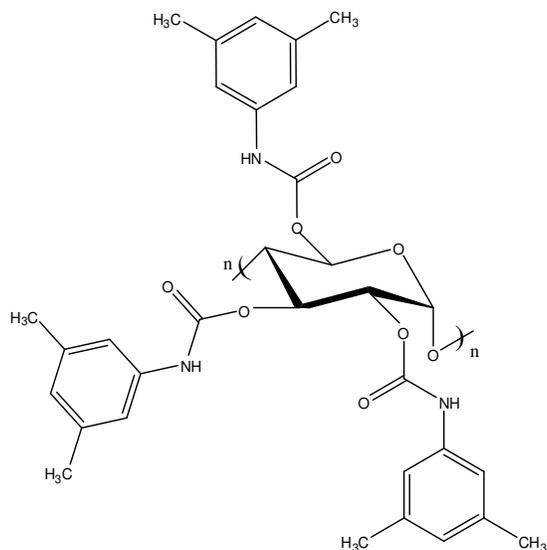


Figura 3.2 - Estrutura química da fase estacionária quiral *tris*(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose.

3.4. Fase Móvel

Utilizou-se solvente grau HPLC para a constituição das fases móveis: 2-propanol, hexano, metanol, etanol e acetonitrila, obtidos da Tedia Brasil.

3.5. Equipamentos

Os experimentos foram realizados num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e em uma unidade de cromatografia contínua com comprimento de zona variável (Micro-Varicol®), Figura 3.3 e Figura 3.4. No primeiro equipamento, constituído por duas bombas da marca Shimadzu Corporation, modelo LC-20 AT e LC-10AD (Japão) e por um detector com detecção UV-VIS da marca Shimadzu Corporation, modelo SPD-20A (Japão) integrados a um sistema de aquisição de dados que utiliza o software LCSolution. A temperatura

da coluna cromatográfica foi controlada com o auxílio de um banho termostático da marca Solab, modelo SL 152 (Brasil).

A unidade Micro-Varicol® desenvolvida pela NOVASEP® para estudo em escala laboratorial é constituída por cinco bombas da marca ARMEN Intruments (França), por um detector com detecção UV-VIS da marca KNAUER, modelo Smartline 2500 (Alemanha) e outro com sensor polarimétrico da marca IBZMESSTECHNIK, (Alemanha). Possui 32 válvulas pneumáticas de alta pressão da marca TOP industrie, modelo NF (França) integradas a 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.

Utilizou-se uma balança analítica da marca Mettler, modelo AJ150 (Suíça) para pesagens dos compostos e um banho ultra-sônico da marca Cole Parmer, modelo 8892R-MT (EUA) para degaseificação das fases móveis.

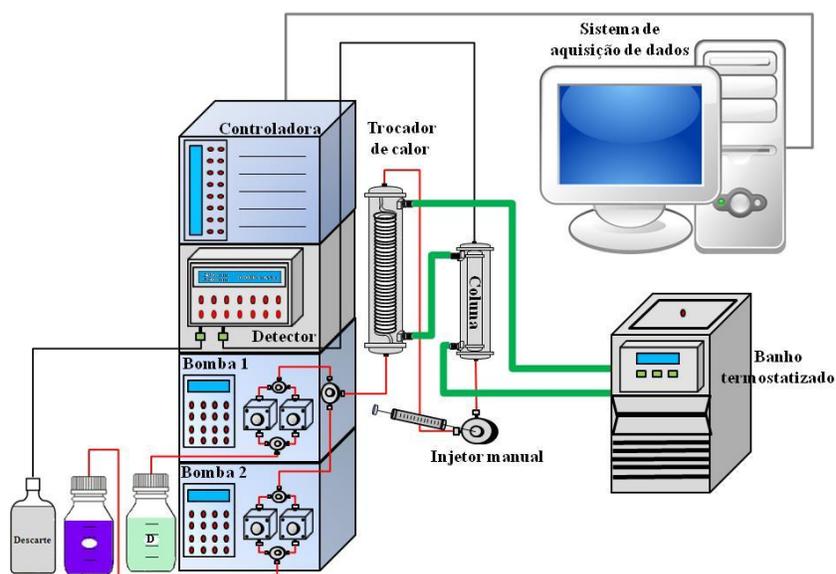


Figura 3.3 - Esquema do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

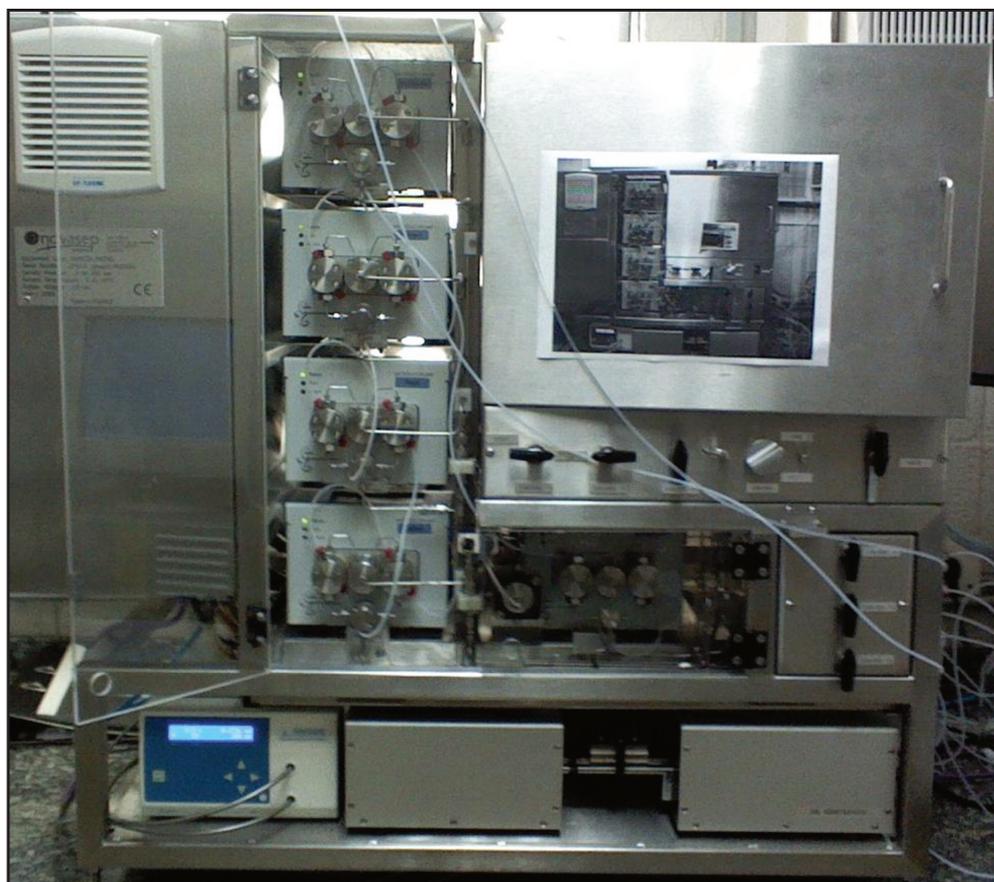


Figura 3.4 - Imagem da unidade Micro-Varicol®. Sistema de cromatografia contínua em leito móvel com comprimento de zona variável.

3.6. Obtenção dos dados de entrada para Software Help®

A Figura 3.5 mostra o diagrama esquemático da sequência de experimentos a serem realizadas em uma única coluna. Estes experimentos foram divididos em três etapas: (i) experimentos em condições analíticas, (ii) experimentos em condições semi-preparativa e, (iii) Inserção dos dados no Software Help® para simular as condições operacionais do Micro-Varicol®. As informações obtidas nos dois primeiros conjuntos de experimentos são úteis para o cálculo de simulação no software Help®. Na etapa (i) foram determinadas as grandezas termodinâmicas que não foram utilizadas na simulação, mas a temperatura dentro deste estudo apresentou grande importância, ou seja, a melhor condição de separação. Na terceira etapa foram

determinadas as isotermas por dois métodos diferentes. No entanto, os dados utilizados para simulação no software Help® foram os tempos das frentes das ondas de choque.

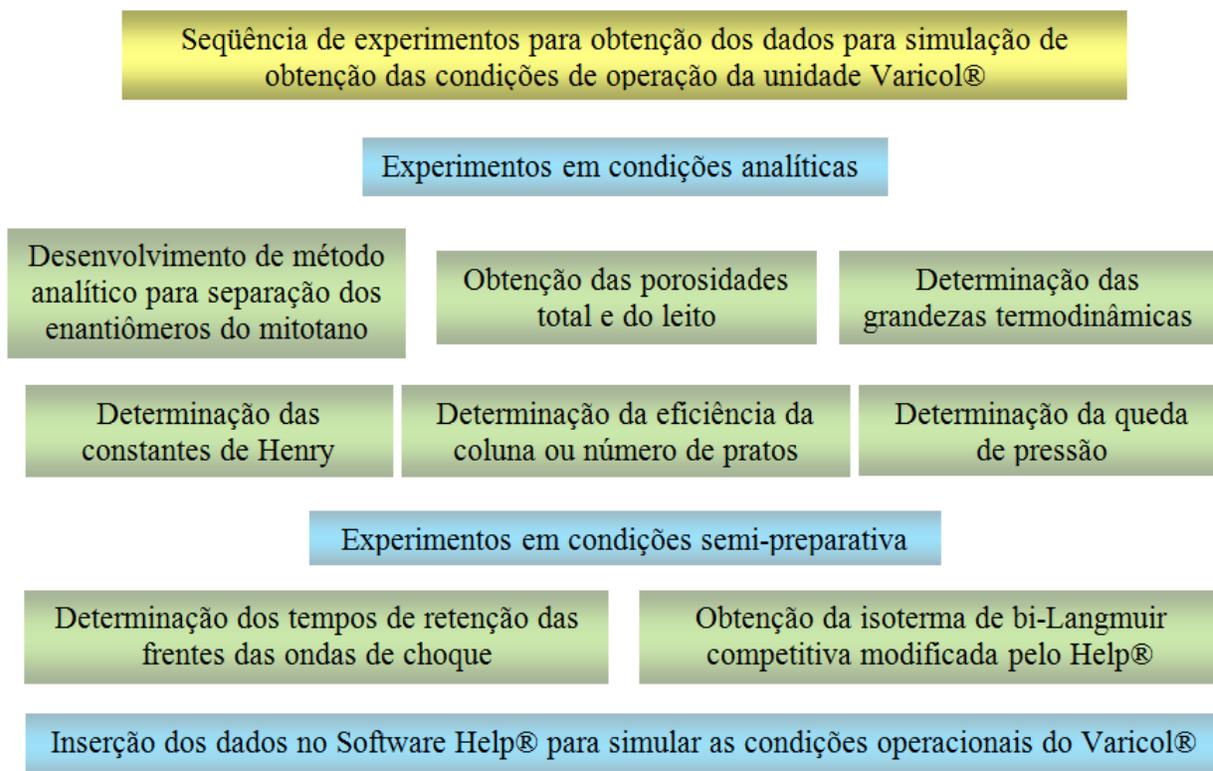


Figura 3.5 - Diagrama da sequência de experimentos em uma única coluna.

3.7. Experimentos em condições analíticas

3.7.1. Desenvolvimento de método analítico para separação dos enantiômeros do mitotano

O método analítico para separação dos enantiômeros do mitotano foi realizado com injeções de 20 µL da solução de mitotano na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarmato) de celulose (25

x 0,46 cm i.d.), em uma concentração de 0,2 mg/mL e vazão de 1,00 mL/min. No modo normal de eluição utilizou-se a fase móvel hexano/etanol nas respectivas proporções 90:10, 95:5 e 98:2. No modo polar orgânico, além da coluna citada avaliou-se também a coluna *tris*(3,5 dimetilfenilcarmato) de amilose (10 x 1,0 cm i.d.), utilizando as fases móveis 2-propanol/metanol e 2-propanol/acetonitrila com as respectivas proporções de 100:0, 50:50, 60:40, 75:25, 0:100.

A ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada utilizando o sistema cromatográfico descrito da seção 3.5, porém substituiu-se o detector UV-Vis por um detector de dicroísmo circular (CD), da marca JASCO, modelo CD-2095 plus. Realizou-se uma injeção de 20 µL da solução de mitotano racêmico na concentração 0,20 mg/mL, com a vazão de 1,00 mL/min de fase móvel composta por 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v). O sistema de análise foi ajustado em 270 nm.

3.7.2. Determinação das porosidades total e do leito

Para a determinação da porosidade total da coluna cromatográfica foi necessário a obtenção de dois dados importantes: (i) volume morto do sistema e o (ii) volume total.

O volume morto foi obtido pela injeção de 20 µL da solução de TTBB (traçador inerte descrito na Seção 3.2), no sistema cromatográfico na ausência da coluna cromatográfica, utilizando uma solução na concentração de 0,1 mg/mL, na vazão de 2,5 mL/min. Esse volume corresponde a todas as tubulações e conexões do sistema cromatográfico, desde do injetor até o detector. O produto entre o tempo de retenção do inerte (t'_{inerte}) e a vazão (Q) resulta no volume morto do sistema (V_M), de acordo com a Equação 3.1.

$$V_M = t'_{\text{inerte}} \times Q \text{ (mL)} \quad (3.1)$$

O valor obtido foi de 0,176 mL. Esse volume foi usado para correções nos experimentos posteriores.

Experimentos de pulsos cromatográficos com o TTBB foram realizados com a finalidade de determinar a porosidade total. O TTBB foi dissolvido na fase móvel, constituída de 2-propanol/acetoneitrila (75:25). Uma solução de concentração de 0,1 mg/mL foi preparada e foram feitas injeções de 20 µl desta solução, após o período de estabilização do sistema a diferentes vazões da fase móvel (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL/min) e temperatura de 25 °C. As respostas dos pulsos cromatográficos com o TTBB foram monitoradas pelo detector UV-Vis no comprimento de onda de 270 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A porosidade total foi obtida através do primeiro momento (Equação 3.2). Como o TTBB é um composto inerte o termo relativo à adsorção é desprezado. A inclinação do gráfico do primeiro momento em função de L/u é o valor da porosidade total (ϵ_T).

$$\mu_1 = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) K \right] + \frac{t}{2} \quad (3.2)$$

A porosidade do leito foi determinada pela injeção de 20 µL da solução de poliestireno (Polymer Laboratoire, Reino Unido) em concentração de 0,1 mg/mL dissolvido em tetrahydrofurano (THF), utilizando como fase móvel etanol 100% com 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA). A estrutura molecular do poliestireno é apresentada na Figura 3.6. Por não sofrer interações com a fase estacionária e devido a sua elevada massa molar de 504500 g/gmol, ele é capaz de difundir pela coluna cromatográfica passando apenas entre as partículas, não adentrando nos poros. O tempo de retenção do poliestireno foi obtido na vazão de 2,0 mL/min e temperatura de 25 °C.

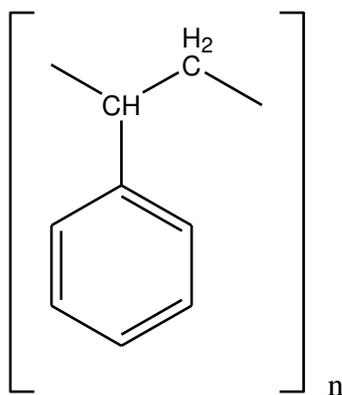


Figura 3.6 - Estrutura química do poliestireno.

O valor da porosidade do leito foi determinado de acordo com a Equação 3.3.

$$\varepsilon = \frac{(t_p \times Q) - V_M}{V_C} \quad (3.3)$$

em que, ε , t_p , V_M , Q e V_C são a porosidade do leito, tempo de retenção do poliestireno, volume morto, vazão da fase móvel e o volume geométrico da coluna, respectivamente.

3.7.3. Determinação das grandezas termodinâmicas

A obtenção das grandezas termodinâmicas dos enantiômeros do mitotano baseou-se na determinação dos fatores de retenção para a mistura racêmica nas temperaturas 20; 25; 30 e 35 °C. A vazão utilizada para estes experimentos foi de 2,0 mL/mim. Inicialmente a coluna foi condicionada com a fase móvel por 90 minutos e a cada mudança na temperatura à coluna foi recondicionada por mais 90 minutos para garantir o equilíbrio de todo o sistema.

A fase móvel utilizada nos experimentos foi preparada com os solventes 2-propanol e acetonitrila na proporção 75:25 v/v. Uma solução de TTBB e mitotano racêmico foram preparadas com o mesmo solvente da fase móvel nas concentrações de 0,120 mg/mL e 0,432 mg/mL, respectivamente. A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon com poros de 0,45 μm , e posteriormente foi realizada degaseificação. Em seguida, realizaram-se injeções de 20 μL das soluções de TTBB e mitotano no sistema de CLAE nas diferentes temperaturas. O comprimento de onda para leitura foi de 270 nm. Os fatores de retenção (k_i) foram calculados a partir dos tempos de retenção de acordo com a Equação 3.5:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (3.5)$$

em que k_i , $t_{R,i}$ e t_0 são o fator de retenção para o enantiômero i , o tempo de retenção do enantiômero i e o tempo morto.

3.7.4. Determinação das constantes de Henry

O cálculo da constante Henry para cada enantiômero foi realizado conforme Equação 3.6. Os dados da porosidade total e dos fatores de retenção para o cálculo foram obtidos nas Seções 3.7.2 e 3.7.3, respectivamente.

$$H_e = \left(\frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \right) \left(\frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \right) = k_i \left(\frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} \right) \quad (3.6)$$

em que k_i , $t_{R,i}$, t_0 e ε_T são o fator de retenção para o enantiômero i , o tempo de retenção do enantiômero i , tempo morto e a porosidade total.

3.7.5. Determinação da eficiência da coluna ou número de pratos

Procedimento similar ao realizado na seção anterior foi conduzido para determinar a eficiência da coluna semi-preparativa *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. No entanto a solução racêmica de mitotano foi injetada na coluna nas vazões 1 a 2,50 mL/min com incrementos de 0,50 mL/min. A largura da banda cromatográfica de cada enantiômero a meia altura da linha de base e o tempo de retenção para as vazões estudadas foram determinadas nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C. Os dados obtidos foram inseridos na Equação 3.7 para calcular o valor do número de pratos nas condições descritas.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (3.7)$$

Os dados de altura da base e tempo de retenção foram obtidos na mesma concentração e comprimento de onda do experimento anterior.

3.7.6. Obtenção das curvas de calibração

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 2,5; 5,0; 10; 20 e 40 µg/mL.

As curvas de calibração foram obtidas através de regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos compostos. Foi considerado o mínimo de 5 concentrações diferentes para a curva de calibração. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de determinação.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção da curva analítica:

Coluna: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (25 x 0,46 cm i.d.);

Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v);

Vazão: 1,0 mL/min;

Temperatura: 25 °C;

Comprimento de onda: 270 nm.

A precisão e exatidão da curva analítica foram avaliadas. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas (n=3). A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem. Os critérios de aceitação para a precisão e exatidão são valores de desvios menores que 5%.⁹⁴

3.7.7. Determinação da queda de pressão

Para a determinação da queda de pressão primeiramente condicionou-se a coluna *tris* (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila 75:25 (v/v) a vazão de 1,00 mL/min durante 90 min, decorrido este período anotou-se pressão verificada na bomba cromatográfica. Posteriormente, substituiu-se a coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose por um tubo de aço inox de mesmo comprimento e diâmetro da coluna utilizada anteriormente e anotou-se novamente a pressão. A queda de pressão da coluna foi determinada pela diferença entre as duas pressões verificadas.

3.8. Experimentos em condições semi-preparativa

3.8.1. Determinação dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque

O sistema Varicol® é operado em condições de isoterma não lineares; experimentos com soluções concentradas foram conduzidos para a determinação dos tempos de retenção das

frentes das ondas de choque, que são necessários para obtenção da isoterma de Langmuir competitiva modificada pelo método do tempo binário de retenção (MTBR).

Inicialmente a coluna cromatográfica *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi condicionada com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila 75:25 (v/v) a vazão de 2,00 mL/min durante 60min. Posteriormente injetou-se 200 μ L da solução racêmica do mitotano na concentração de 100 mg/mL. A temperatura foi controlada a 25 °C e as bandas cromatográficas foram monitoradas por um detector UV-Vis a 280 nm. Os mesmos procedimentos foram realizados para as concentrações na faixa de 150 a 300 mg/mL com incrementos de 50 mg/mL.

A partir dos cromatogramas obtidos determinaram-se os pontos de inflexão das bandas cromatográficas formadas por ambos os enantiômeros eluídos. O método utilizado para determinar o ponto de inflexão foi o de derivada primeira. Estes pontos de inflexão correspondem aos tempos de retenção das frentes das ondas de choque.

3.8.2. Determinação das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal

A obtenção das isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano baseou-se na determinação da curva de ruptura para a mistura racêmica nas concentrações de 1,0; 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/mL. A vazão utilizada para estes experimentos foi de 2,0 mL/min. Inicialmente a coluna foi condicionada com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) por 90 minutos. Posteriormente programou-se uma troca na alimentação do sistema, na qual uma segunda bomba alimentou o sistema com uma solução de mitotano por 10 minutos. Decorrido esses 10 minutos mudou-se novamente a alimentação para a fase móvel e assim permaneceu até completa eluição do mitotano da coluna. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, uma vez que nesse comprimento de onda os enantiômeros do mitotano absorvem menos e assim não há saturação do detector.

No mesmo instante em que iniciou a alimentação no sistema também começaram as sucessivas coletas do eluato, com intervalos de 1 min. As coletas realizadas foram analisadas

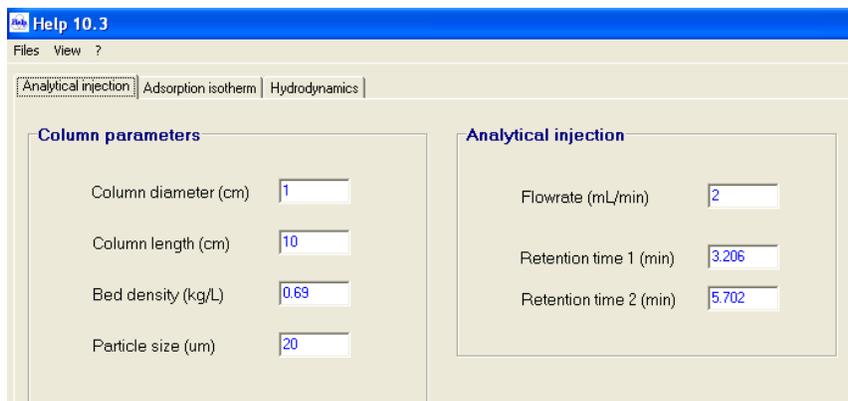
posteriormente em um sistema de HPLC para a determinação das respectivas concentrações dos enantiômeros do mitotano, utilizando a curva de calibração descrita na Seção 3.7.6.

3.9. Sequência de inserção dos dados no Software Help® para simular as condições operacionais do Varicol®

Os dados obtidos em condições analítica e semi-preparativa, os números de pratos e a queda de pressão na fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foram inseridos no software Help® desenvolvido pela Novasep®.

Segue abaixo as etapas de inserção dos dados para simular as condições operacionais do Varicol®.

Na primeira etapa, dentro da janela do Help® mostrado na Figura 3.7 foram inseridas as medidas dos parâmetros da coluna (diâmetro, comprimento, densidade do leito e tamanho da partícula) e as condições obtidas através de uma injeção analítica (vazão e tempo de retenção dos dois enantiômeros).



The screenshot shows the 'Help 10.3' software interface. The title bar reads 'Help 10.3' and the menu bar includes 'Files View ?'. Below the menu bar, there are three tabs: 'Analytical injection' (selected), 'Adsorption isotherm', and 'Hydrodynamics'. The main area is divided into two panels:

- Column parameters:**
 - Column diameter (cm): 1
 - Column length (cm): 10
 - Bed density (kg/L): 0.69
 - Particle size (um): 20
- Analytical injection:**
 - Flowrate (mL/min): 2
 - Retention time 1 (min): 3.206
 - Retention time 2 (min): 5.702

Figura 3.7 - Janela de entrada de dados software Help® que se refere às medidas dos parâmetros da coluna e a injeção analítica.

Na segunda etapa, foram inseridos os dados obtidos das injeções de sobrecarga, ou seja, vazão, volume injetado, concentração dos enantiômeros e os tempos de retenção das frentes das ondas de choque. Em seguida o ícone “calculate” foi acionado, que gerou os valores dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitiva modificada como mostrado na Figura 3.8. Na sequência o ícone “verify” foi acionado para calcular o erro dos valores experimentais dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque (TRFOC) em relação ao simulado. Caso ocorra um desvio no erro relativo é necessário repetir o procedimento de determinação dos TRFOC. A Figura 3.9 mostra o quadro com os pontos experimentais sobre o calculado.

The screenshot shows the 'Help 10.3' software interface. It has a menu bar with 'Files', 'View', and '?'. Below the menu bar are three tabs: 'Analytical injection', 'Adsorption isotherm' (which is selected), and 'Hydrodynamics'. The main window is divided into two sections: 'Overloaded injections' and 'Isotherms parameters'.

Overloaded injections

	Q (mL/min)	Vinj (uL)	C1 (g/L)	C2 (g/L)	tr1 (min)	tr2 (min)
inj 1	2	200	50	50	3.04167	4.2639
inj 2	2	200	75	75	3.025	4.000
inj 3	2	200	100	100	3.000	3.78333
inj 4	2	200	125	125	2.99167	3.65000
inj 5	2	200	150	150	2.96667	3.55833
inj 6						

Isotherms parameters

$$\bar{C}_i = \lambda \cdot C_i + \frac{\bar{N} \tilde{K}_i C_i}{1 + \tilde{K}_1 C_1 + \tilde{K}_2 C_2}$$

	λ	$\bar{N} \tilde{K}_i$	\bar{N}
Esp1	0.5	0.1940	24
Esp2	0.5	1.2533	24

At the bottom of the window are two buttons: 'CALCULATE' and 'VERIFY'.

Figura 3.8 - Janela de entrada e saída dos dados do software Help® que se refere às medidas de sobrecarga e os parâmetros da isoterma de adsorção.

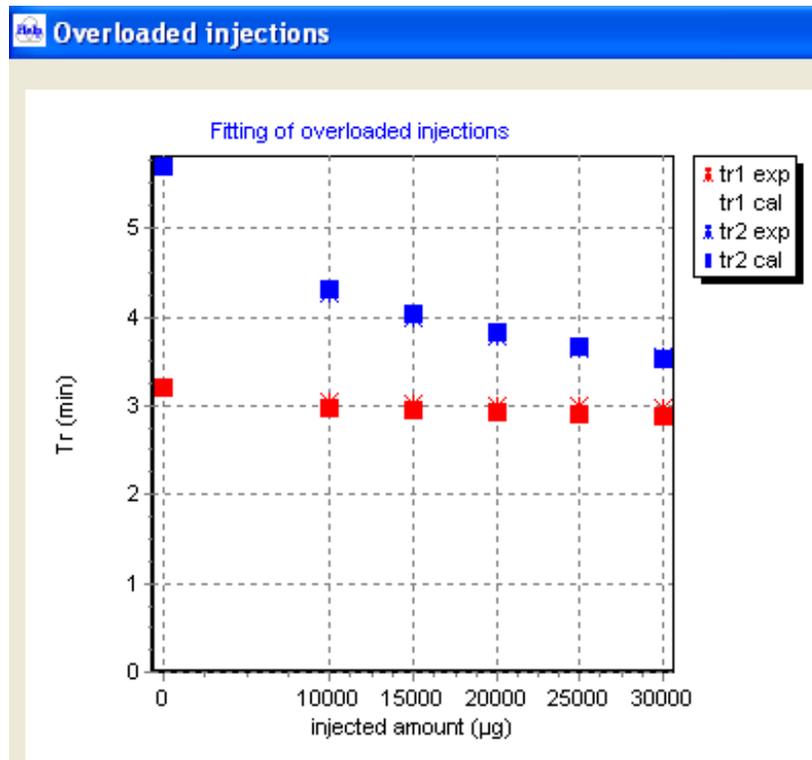


Figura 3.9 - Curva dos tempos de retenção em função da quantidade injetada sobre condições de sobrecarga do software Help®.

Na terceira etapa, Figura 3.10, foram inseridos os valores calculados do número de pratos da coluna e as correspondentes vazões, que podem ser tanto para o primeiro ou segundo enantiômero determinados como descrito na Seção 3.7.5; em seguida o ícone “calculate” foi acionado para gerar a função de HETP conforme a curva de van Deemter modificada (Equação 2.8). Ainda dentro desta etapa o valor da pressão exercida pelo leito referente à respectiva vazão foi inserido no software Help® para gerar a queda de pressão calculada de acordo com a Lei de Darcy dada pela Equação 3.8:

$$\frac{\Delta P}{L} (\text{bar} / \text{cm}) = k \times v \text{ (cm/s)} \quad (3.8)$$

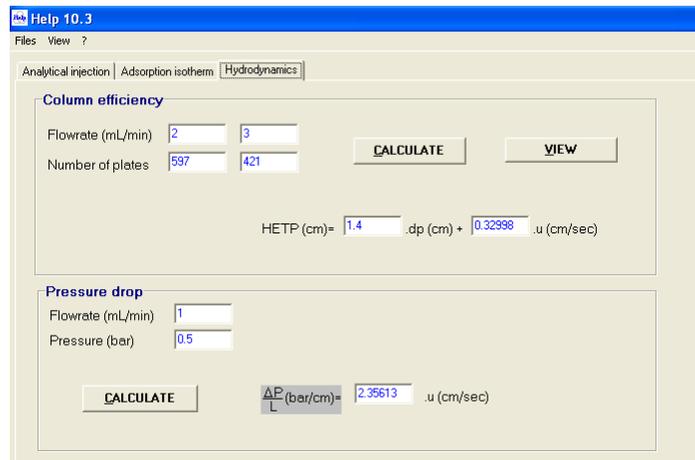


Figura 3.10 - Quadro de entrada e saída de dados da eficiência da coluna e da queda de pressão do software Help®.

Dados adicionais para a obtenção de parâmetros importantes para serem alimentados ao sistema Varicol®, tais como: densidade do leito, tamanho da partícula empacotada na coluna, pressão máxima permitida nas colunas, diâmetro e comprimento das colunas, solubilidade da alimentação e composição da alimentação são dados típicos para as corridas iniciais visando à separação do mitotano que constam na Figura 3.7 e Figura 3.11.

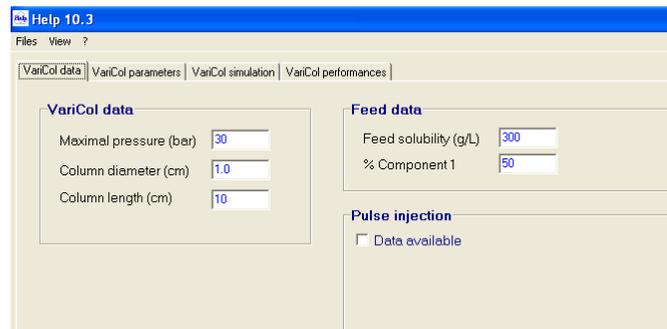


Figura 3.11 - Outros dados de entrada para o cálculo das vazões projetadas para as correntes no sistema Varicol®.

Na quarta etapa (Figura 3.12), os valores das vazões da bomba de reciclo, da bomba de alimentação, da bomba de extrato, da bomba de refinado, o tempo de troca, os números de colunas em cada zona, a concentração da alimentação e o número de pratos por colunas correspondentes as condições operacionais do Varicol® foram calculados pelo software Help®.

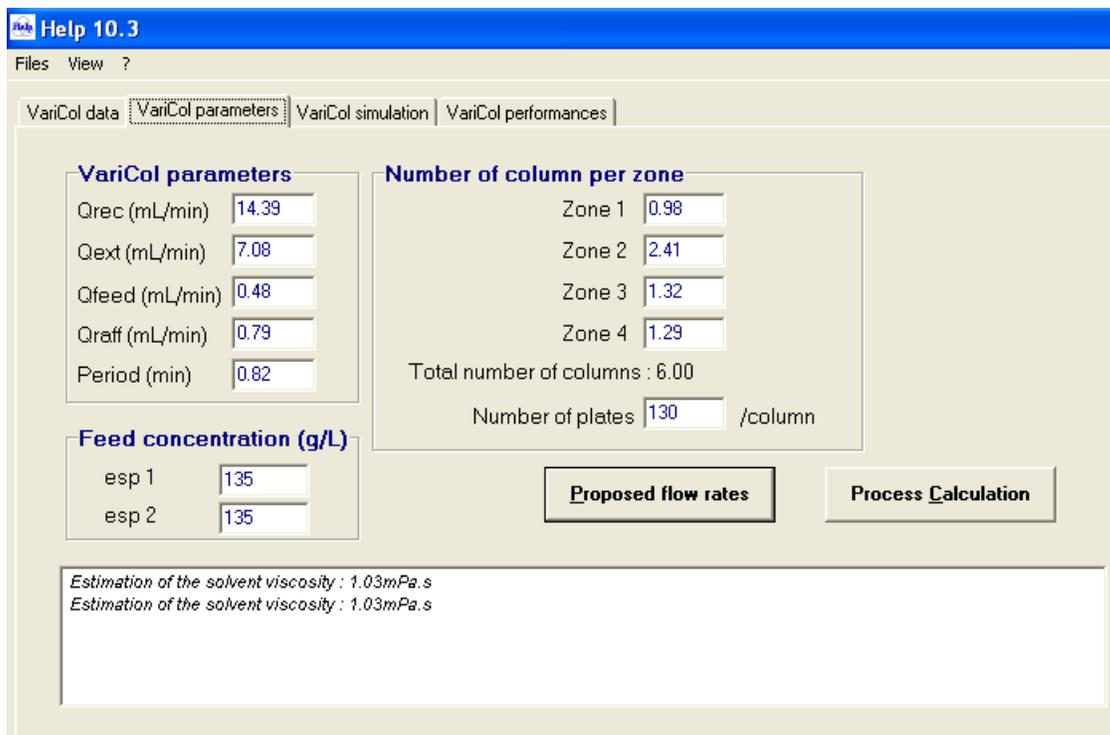


Figura 3.12 - Parâmetros projetados para o sistema Varicol®.

O software Help® permite prever os perfis internos, as produtividades, a produção e o consumo de solvente, teoricamente esperados a serem obtidos no sistema Varicol® (Figura 3.13 e Figura 3.14).

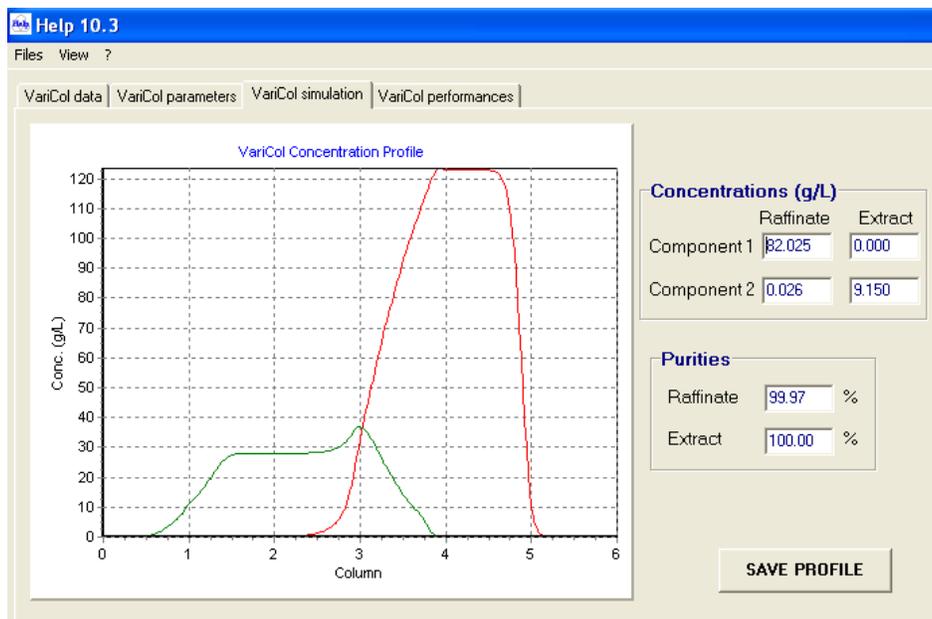


Figura 3.13 - Perfil interno de concentrações previsto teoricamente.

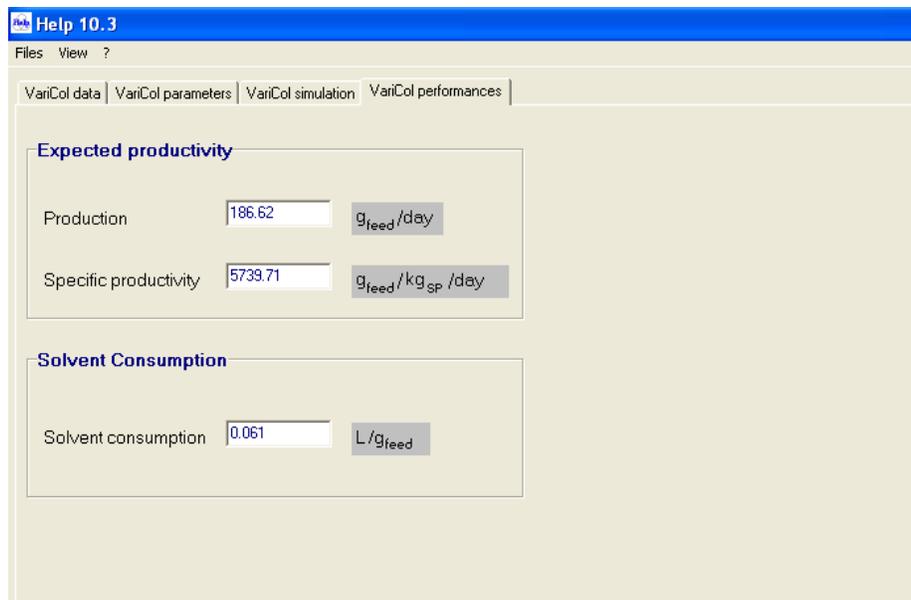


Figura 3.14 - Produção, produtividade e consumo de solventes calculados teoricamente pelo software Help®.

3.10. Separação dos enantiômeros por cromatografia em batelada

A coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10,0 x 1,0 cm) foi condicionada com a fase móvel acetonitrila/2-propanol a uma vazão de 2,5 mL/min e detecção no UV em 280 nm.

Uma massa de 625 mg de mitotano racêmico foi pesada e solubilizada em 5,0 mL da fase móvel. A solução de mitotano racêmico foi injetada no sistema cromatográfico com alça dosadora de 200 µL. As frações de R-(+) e S-(-)-mitotano foram coletadas nas áreas demarcadas para coleta e as frações obtidas foram rotaevaporadas. A pureza dos enantiômeros em cada fração coletada foi determinada injetando-se 20 µL de cada amostra no sistema cromatográfico e analisando-se a área sob o perfil de eluição em cada situação, de acordo com a Equação 3.9.

$$P_i = \left(\frac{Área_i}{Área_1 + Área_2} \right) \times 100 \quad i = 1, 2 \quad (3.9)$$

3.11. Separação dos enantiômeros por cromatográfica contínua (Varicol®)

Os parâmetros projetados pelo programa Help® como vazão de reciclo, alimentação, extrato e refinado e o tempo de troca serviram como parâmetros iniciais do Varicol®. Estes parâmetros foram inseridos para dar partida no sistema de cromatografia contínua que após o início aguardou-se 1h e 30 min para atingir o estado estacionário.

Depois de ter alcançado o estado estacionário foi coletado amostras nas linhas de extrato e refinado para análises das purezas. Em seguida foram coletadas amostras dentro de um único ciclo para determina o perfil de concentração interno (PCI), em que o tempo e a posição de coleta foram calculados de acordo com o manual do usuário fornecido pela Novasep.

A otimização da separação dos enantiômeros do mitotano na unidade de separação contínua de leito móvel simulado (LMS) operando no modo Varicol® foi avaliada pelos parâmetros de desempenho definidos na Tabela 4, descrita na Seção 2.11.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimentos em condições analíticas

4.1.1. Desenvolvimento de método analítico para separação dos enantiômeros do mitotano

Para a separação analítica dos enantiômeros do mitotano avaliou-se a coluna *tris*(3,5 dimetilfenilcarmato) de celulose (25 x 0,46 cm i.d.), conhecida comercialmente por Chiralpak OD, com diferentes fases móveis. Utilizou-se primeiramente o modo normal com hexano e etanol como modificador em diferentes proporções, porém não se obteve separação por linha de base. As fases móveis 2-propanol/metanol e 2-propanol/acetonitrila foram também investigadas e nenhuma separação foi conseguida.

No trabalho realizado por da Silva Junior⁹⁵ que investigou a separação dos enantiômeros do mitotano com a fase estacionaria *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Chiralpak AD), constatou que a fase móvel 2-propanol/metanol (60:40 v/v) apresentou excelente fator de separação e resolução. Além disso, verificou que a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (50:50 v/v) teve uma boa separação com maior solubilidade do mitotano que a fase móvel anterior. No entanto, na mesma época a acetonitrila estava escassa no mercado e não foi possível investigar a separação com maiores detalhes. A partir desse trabalho foi dado continuidade na investigação da separação dos enantiômeros do mitotano e foi verificado que o melhor fator de separação e resolução alcançado foi, com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) na fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. As Figura 4.1 e Figura 4.2 mostram os cromatogramas obtidos com as fases móveis 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) e 2-propanol/metanol (60:40 v/v), respectivamente.

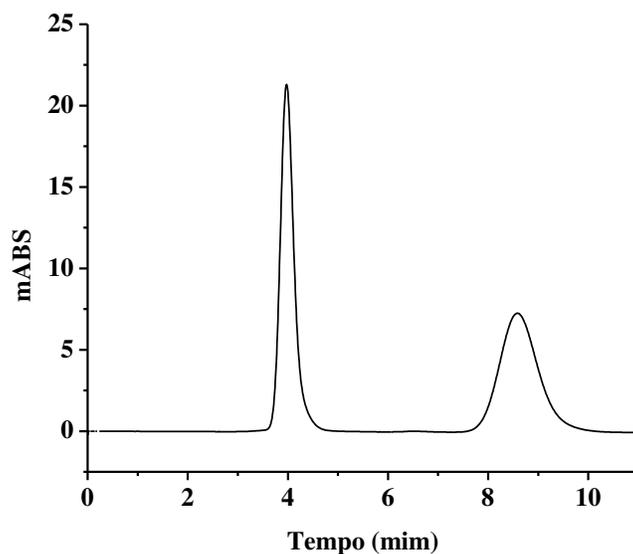


Figura 4.1 - Cromatogramas da separação do mitotano na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm). Vazão de 2,0 mL/mim e $\lambda = 270$ nm. Utilizando como fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v).

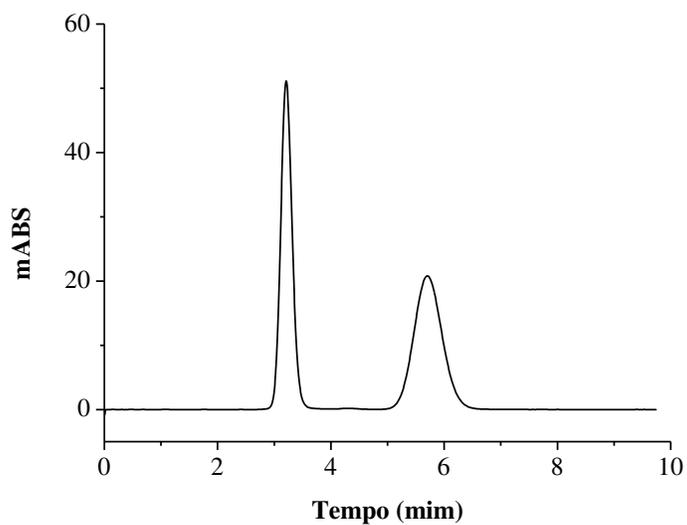


Figura 4.2 - Cromatogramas da separação do mitotano na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm). Vazão de 2,0 mL/mim e $\lambda = 270$ nm. Utilizando como fase móvel 2-propanol/metanol (60:40 v/v).

Pode-se observar pelos cromatogramas da Figura 4.1 e Figura 4.2 e os dados apresentados na Tabela 4.1, que a fase estacionária Chiralpak AD apresentou excelente discriminação quiral para os enantiômeros do mitotano, apresentando ótimos fatores de separação ($\alpha = 4,90$ e $6,22$) e de resolução ($R_s = 4,10$ e $4,98$).

Tabela 4.1 - Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos com a solução de mitotano em coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Fase Móvel	k_1	k_2	A	R_s
2-propanol/MeOH (60:40 v/v)	0,42	2,06	4,90	4,10
2-propanol/ACN (75:25 v/v)	0,15	0,96	6,22	4,98

A condição cromatográfica utilizando como fase móvel 2-propanol/acetoneitrila (75:25 v/v) foi selecionada para os próximos estudos apresentados neste trabalho, uma vez que essa fase móvel apresentou maior seletividade e resolução, além de apresentar uma melhor solubilidade do mitotano, cerca de três vezes maior quando comparado com 2-propanol/metanol (60:40 v/v) ⁹⁵.

Trabalho realizado por Cantillana *et. al.* ²⁹ determinaram a configuração absoluta dos enantiômeros do mitotano por cristalografia de raios X e obteve-se que os enantiômeros do mitotano são R-(+) e S(-).

Utilizando a condição cromatográfica escolhida para o desenvolvimento deste trabalho, a ordem de eluição dos enantiômeros do mitotano foi determinada e está apresentada na Figura 4.3. Os picos negativo e positivo que estão antes dos picos dos enantiômeros foram ocasionados por uma pequena diferença na concentração da fase móvel com a solução de mitotano injetada na coluna, uma vez que qualquer variação na concentração do 2-propanol pode provocar este tipo perturbação.

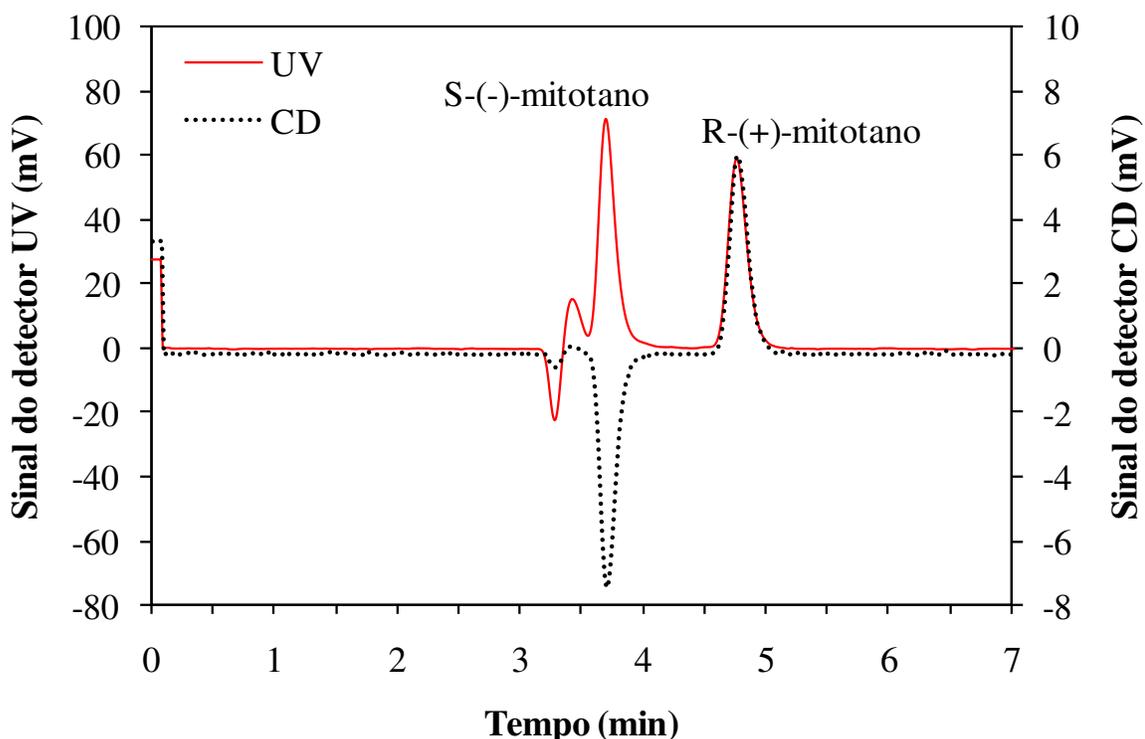


Figura 4.3 - Cromatogramas para determinação de (+) e (-) mitotano no dicroísmo circular. Coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0 cm i.d.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v); vazão: 2,0 mL/min; V_{inj} : 20 μ L e λ : 270nm.

4.1.2. Determinação das porosidades total e do leito

A porosidade total (ϵ_T) da coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10 cm x 1,0 cm i.d.) foi determinada a partir da Equação 3.2 de acordo com método proposto. O valor da porosidade total, encontrada na temperatura de 25 °C foi de 0,668, com coeficiente de correlação igual a 1. A Figura 4.4 apresenta o gráfico do primeiro momento, que corresponde aos tempos de retenção do TTBB em diferentes vazões subtraídos pelos respectivos tempos mortos, em função de L/u (comprimento da coluna por velocidade superficial). O coeficiente angular da reta corresponde ao valor da porosidade total obtido na temperatura de 25°C da fase estacionária Chiralpak AD.

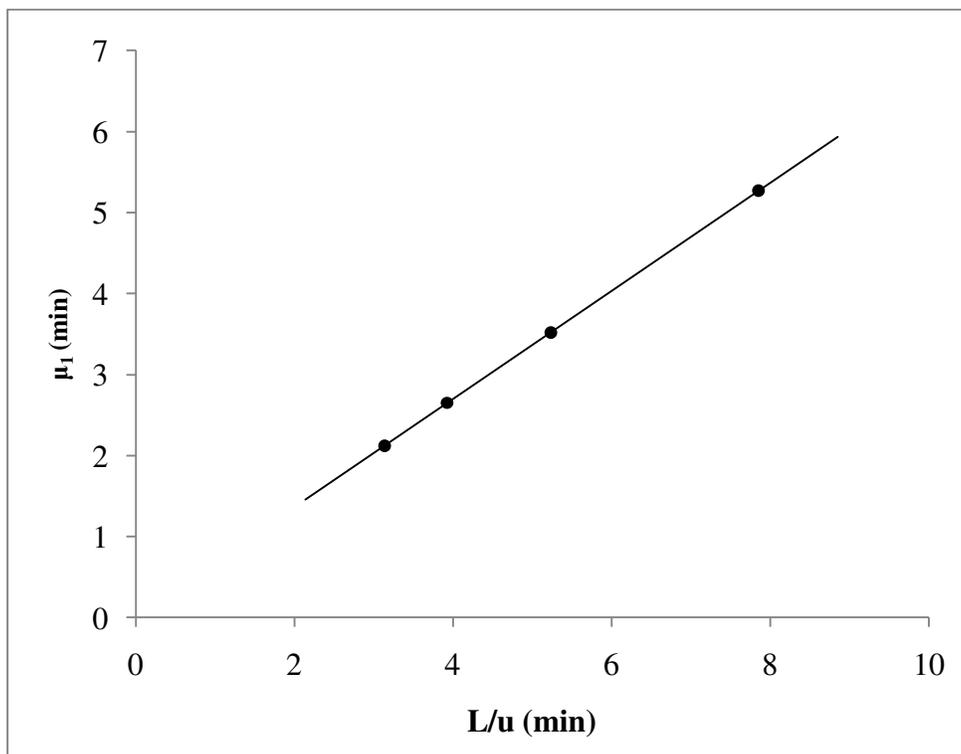


Figura 4.4 - Curva do primeiro momento para o composto inerte TTBB a 25 °C.

Mihlbachler *et al.*⁶⁰ determinaram a porosidade total da coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, (10,0 x 1,0 cm i.d.) com tamanho médio de partículas de 20 μm , com a fase móvel metanol e uma solução de TTBB e o valor encontrado foi de 0,648. Outro estudo realizado por Zabka e Rodrigues⁹⁶ também determinaram a porosidade total na mesma fase estacionária, neste caso utilizando a fase móvel n-heptano/2-propanol (95:5 v/v) e a porosidade encontrada foi de 0,610.

A diferença encontrada na porosidade total entre o obtido neste trabalho e dos autores citados deve-se às condições distintas sob as quais as colunas foram empacotadas.

4.1.2.1. Determinação da porosidade do leito

Não há relatos na literatura a respeito da determinação da porosidade do leito em colunas cromatográficas com fases estacionárias quirais de polissacarídeos. Alguns estudos de casos atribuem que a porosidade do leito mais adequada para este tipo de fase está entre 0,40 e 0,43. Por exemplo, o trabalho relatado por Zabka e Rodrigues ⁹⁶, em que estudaram os parâmetros cinéticos de adsorção e termodinâmicos na enantioseparação de R, S- α -tetralol e assumiu-se que a porosidade do leito na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose era 0,40.

Em trabalho realizado por Wongso *et al.* ⁹² na otimização dos parâmetros de operação de um sistema baseado no leito móvel simulado utilizado na separação dos enantiômeros de SB-563261 com a fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose atribuiu que a porosidade do leito era 0,43.

Nos trabalhos citados não apresentaram o método utilizado na determinação da porosidade do leito da fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. No entanto, a determinação da porosidade do leito se baseou no trabalho de Da Silva Junior *et al.* ⁷³, o qual estudaram a separação dos enantiômeros da bupivacaína, rolipram e o omeprazol na fase estacionária quiral O,O'-bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N'-dialil-l-tartardiamida, em que mencionam que a porosidade do leito foi determinada com poliestireno e fase móvel tetrahydrofurano.

O tetrahydrofurano por se tratar de um solvente que pode solubilizar a fase estacionária quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, não foi utilizado como fase móvel. A alternativa foi utilizar como fase móvel uma solução de etanol/TFA descrito na Seção 3.7.2 e a solução de poliestireno. A solução de poliestireno foi preparada com tetrahydrofurano na concentração de 0,1 mg/mL. A determinação da porosidade do leito foi realizada de acordo com o método descrito na Seção 3.7.2 e o valor encontrado foi de 0,40. Portanto, a porosidade do leito calculada apresenta uma boa correlação com os valores assumidos pelos trabalhos mencionados anteriormente.

4.1.3. Grandezas termodinâmicas

As grandezas termodinâmicas ΔG^0 , ΔS^0 e ΔH^0 foram determinadas na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose através dos gráficos de van't Hoff, utilizando-se a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) na vazão de 1 mL/min em diferentes temperaturas. A grandeza termodinâmica, ΔG^0 , foi calculado pela Equação 2.10, enquanto os valores de ΔS^0 e de ΔH^0 advêm da Equação 2.12.

A Figura 4.5 apresenta os cromatogramas obtidos na separação do mitotano de onde se obteve os fatores de retenção (k') para o cálculo das grandezas termodinâmicas. Os fatores de retenção, seletividade e resolução estão apresentados na Tabela 4.2.

De acordo com a Figura 4.5 observou-se que o enantiômero R-(+)-o,p'-DDD diminui o tempo de retenção com o aumento da temperatura, enquanto que o S-(-)-o,p'-DDD praticamente não ocorreu nenhuma variação na sua retenção. A energia do complexo diastereoisomérico transitório formado entre o seletor quiral e o enantiômero R-(+) é menor em temperaturas maiores e mais influenciada do que o S-(-). Isto significa que o aumento da temperatura é um processo desfavorável na separação dos enantiômeros por adsorção na fase estacionária quiral estudada.

Tabela 4.2 - Fatores de retenção, seletividade e resolução dos enantiômeros do mitotano em diferentes temperaturas.

T (°C)	k_1	k_2	α	R_S
20	0,158	1,153	7,297	5,416
25	0,155	0,966	6,232	4,987
30	0,149	0,862	5,785	4,805
35	0,146	0,765	5,240	4,519

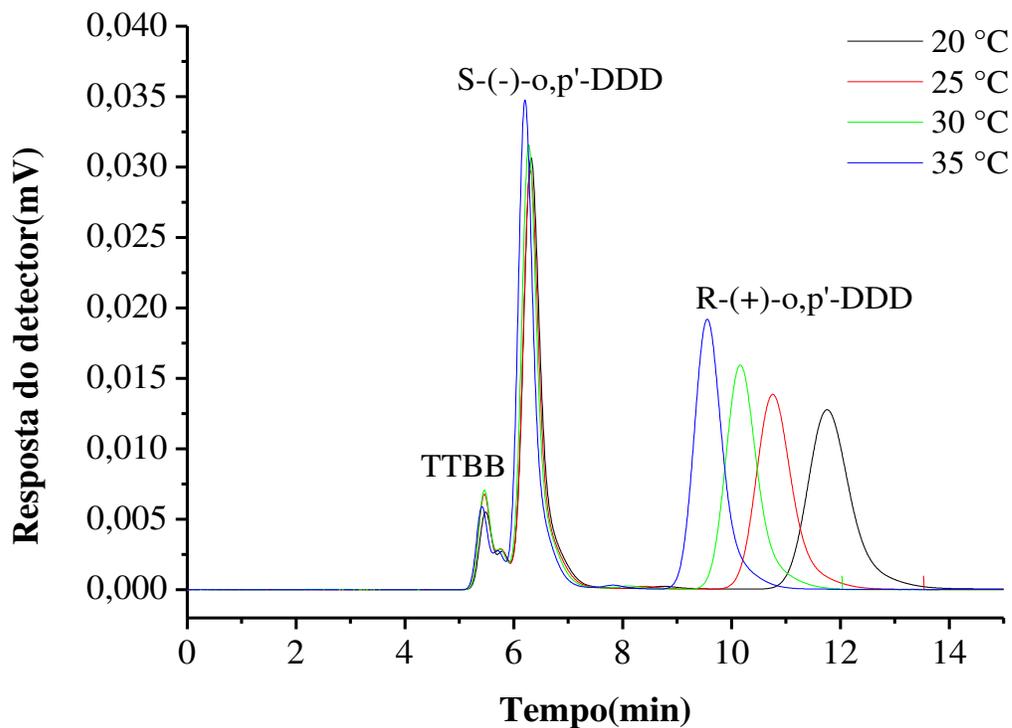


Figura 4.5 - Cromatogramas dos perfis de eluição para os enantiômeros do mitotano obtidos na fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose com diferentes temperaturas. Fase móvel 2-propanol/acetoneitrila (75:25 v/v), volume de injeção de 20 μ L, vazão de 1,0 mL/min e $\lambda=270$ nm.

As curvas de van't Hoff obtidas para ambos os enantiômeros do mitotano estão apresentadas na Figura 4.6.

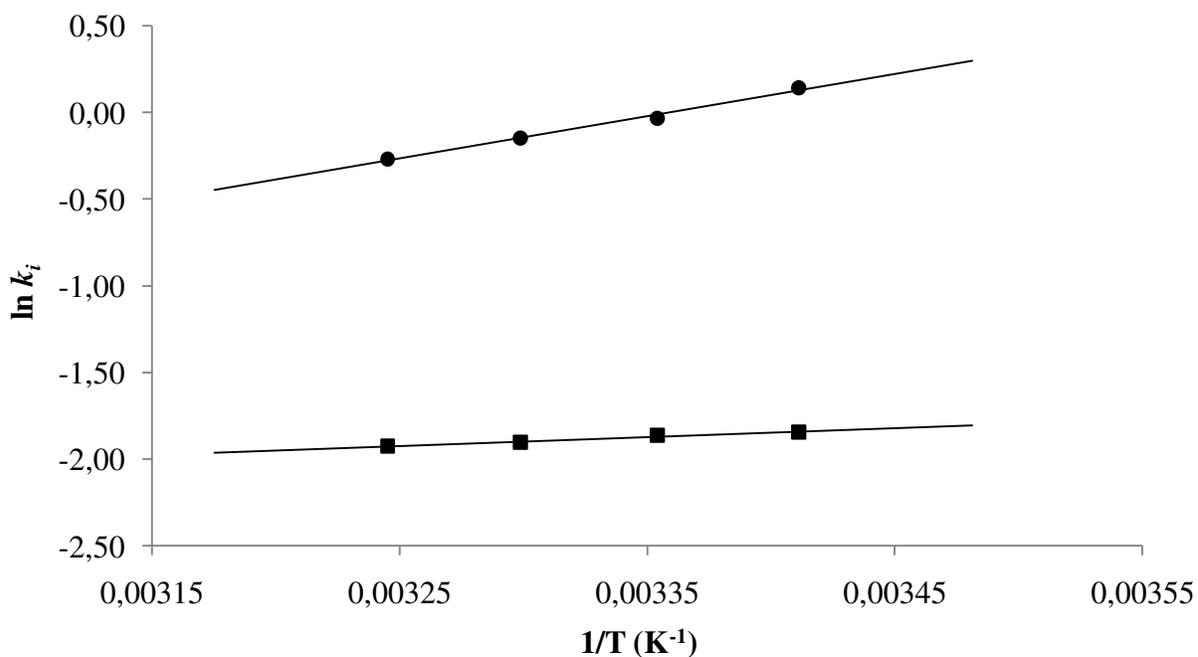


Figura 4.6 - Curvas de van't Hoff para os enantiômeros do mitotano em fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose: (■) S-(-)-o,p'-DDD, (●) R-(+)-o,p'-DDD.

Os coeficientes de correlação obtidos da reta formada por $\ln k_i$ versus $1/T$ para os enantiômeros em estudo, na faixa de temperatura estudada, foram de 0,9912 e 0,9826 para os enantiômeros S-(-)-o,p'-DDD e R-(+)-o,p'-DDD, respectivamente. O sistema demonstra um comportamento linear, ou seja, apresenta mecanismo de reconhecimento quiral rígido, uma vez que a sua conformação não sofreu variação com a temperatura. Tal observação também se encontra nos trabalhos de Yang *et al*⁷⁴ e Goossens *et al*.⁹⁷.

Os valores das grandezas termodinâmicas calculadas para os enantiômeros S-(-)-o,p'-DDD e R-(+)-o,p'-DDD estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Grandezas termodinâmicas calculadas para os enantiômeros S-(-)-o,p'-DDD e R-(+)-o,p'-DDD.

Enantiômero	ΔH^0 (kJ.mol ⁻¹)	ΔS^0 (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G_{20\text{ }^\circ\text{C}}$ (kJ.mol ⁻¹)	Coef. de correlação (R ²)
S-(-)-o,p'-DDD	-4,28	-3,59	-3,21	0,9912
R-(+)-o,p'-DDD	-20,23	-8,18	-17,79	0,9826

Avaliando o efeito da temperatura sobre a grandeza termodinâmica ΔG , verificou-se diferença de espontaneidade entre os dois enantiômeros. Para o S-(-)-o,p'-DDD o valor calculado foi de -3,21 kJ.mol⁻¹, indicando processo de adsorção menos favorável quando comparado ao R-(+)-o,p'-DDD, que o valor calculado de ΔG foi de -17,79 kJ.mol⁻¹, um valor em módulo 5,5 vezes maior.

Alguns autores sugerem que o valor negativo para ΔH^0 indica que o fenômeno de adsorção dos enantiômeros na fase estacionária é dirigido entalpicamente^{68,73}. Verifica-se, no presente trabalho, o mesmo comportamento.

4.1.4. Determinação das constantes de Henry

O método de pulso é a metodologia mais rápida para obter os parâmetros de operação (vazão de alimentação, vazão de refinado, vazão de extrato, produtividade e consumo de solvente) de um leito móvel simulado que é justamente a obtenção do coeficiente de partição ou constante de Henry (H_e).

Neste trabalho, os valores da H_e para os enantiômeros do mitotano foram determinados, de acordo com a Equação 3.6, a partir dos fatores de retenção de cada enantiômero (Figura 4.5 e Tabela 4.2) e da porosidade total obtida anteriormente (Seção 4.1.2). Sabe-se que H_e é uma propriedade termodinâmica; isto significa que varia com a temperatura. Sendo assim, a H_e foi determinada em diferentes temperaturas que variou de 20 a 35 °C com incrementos de 5 °C. A

Tabela 4.4 apresenta os resultados das constantes de Henry (H_e) para os enantiômeros do mitotano nas condições de vazão da fase móvel e temperaturas avaliadas.

Tabela 4.4 - Variação da constante de Henry em função da temperatura obtida na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose com a fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) e vazão de 1 mL/mim.

T (°C)	Constante de Henry (H_{ei})		
	$H_{eS(-)}$	$H_{eR(+)}$	α
20	0,336	2,450	7,297
25	0,329	2,053	6,232
30	0,316	1,832	5,785
35	0,310	1,625	5,240

Com os resultados obtidos observou-se que a H_e diminuiu com o aumento da temperatura, este fato foi mais evidenciado para o enantiômero R-(+). Isto significa que o S(-) nas condições estudadas apresenta pouca interação com a fase estacionária e quem governa a separação dos enantiômeros do mitotano é o R-(+), devido ao seu maior tempo retenção com a fase estacionária. Dentro deste contexto a H_e tem relação com a capacidade de adsorção dos enantiômeros na fase estacionária, ou seja, o enantiômero R-(+)-o,p'-DDD apresenta um maior número de moléculas adsorvida na fase estacionária que se encontra em equilíbrio com a concentração na fase líquida comparada ao enantiômero S(-)-o,p'-DDD.

4.1.5. Eficiência de separação da coluna

A eficiência da coluna cromatográfica está baseada na equação de van Deemter (Equação 4.1), que descreve a relação entre a eficiência, expressa em altura de prato (H , cm), velocidade linear da fase móvel (u , cm/s) e diâmetro da partícula (d_p).

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + f(k) \frac{d_p^2}{D_M} u = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (4.1)$$

em que, λ é uma constante de empacotamento, γ é o fator de obstrução da difusão do leito empacotado, D_M é o coeficiente de difusão da fase móvel e $f(k)$ é uma função do fator de retenção (k). Os termos A, B e C são os coeficientes da equação de van Deemter.

O termo A refere-se à contribuição do alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. Este termo é influenciado pelo tamanho das partículas que está associado aos caminhos percorrido pela molécula, então, a vazão e a temperatura contribuem com o alargamento dos picos devido essas duas grandezas influenciarem na turbulência da fase móvel que conduz o analito. O termo B, que se refere à difusão longitudinal ou difusão molecular, é também influenciado pela temperatura, pois o aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel que contribui no aumento da difusão e consequentemente contribui na diminuição da eficiência da coluna. O termo C da equação de van Deemter representa principalmente à resistência de transferência de massa que é diretamente proporcional a temperatura. Este termo está associado com o equilíbrio instantâneo entre soluto na fase móvel com o soluto adsorvido na fase estacionária e quando o período de equilíbrio diminui, significa que maiores eficiências são alcançadas devido ao aumento temperatura.

A contribuição de cada termo da equação de van Deemter influenciou na eficiência da coluna ou número de pratos (N) da coluna cromatográfica com a variação da temperatura e vazão da fase móvel. A eficiência foi determinada a partir Equação 3.7. A Tabela 4.5 e Tabela 4.6 expõem os valores de N nas faixas de vazão e temperaturas estudadas. Os valores de N alcançados revelam alta eficiência de separação da coluna, destacando os valores superiores a 2000 para a vazão de 1,00 mL/min e temperatura de 35 °C.

Observa-se que, a uma vazão constante, os valores de N aumentaram com o aumento da temperatura, isso porque o terceiro termo da equação de van Deemter em relação aos outros dois termos teve uma contribuição mais significativa e proporcionou a diminuição do espalhamento dos picos cromatográficos que ocasionaram na obtenção de maiores eficiências. Por outro lado, mantendo-se a temperatura constante, os valores das eficiências diminuíram com o aumento da vazão. Isso ocorreu devido à maior turbulência causada pela fase móvel e conseqüentemente os equilíbrios entre os enantiômeros na fase móvel com os enantiômeros adsorvido na fase estacionária foram alcançados em alturas de pratos maiores.

Tabela 4.5 - Dados de eficiência obtidos na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose para o enantiômero S-(-)-mitotano em diferentes temperaturas e vazões.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)			
	20	25	30	35
	$N_{S(-)}$			
1,0	1904	1992	2167	2249
1,5	1492	1576	1741	1842
2,0	1226	1326	1436	1573
2,5	1036	1127	1234	1354

Tabela 4.6 - Dados de eficiência obtidos na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) para o enantiômero R-(+)-mitotano em diferentes temperaturas e vazões.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)			
	20	25	30	35
	$N_{R(+)}$			
1,0	1087	1258	1431	1589
1,5	784	925	1059	1207
2,0	625	734	860	968
2,5	511	611	717	838

4.2. Experimentos em condições semi-preparativas

4.2.1. Obtenção dos tempos das frentes das ondas de choque

O sistema Varicol® é operado no estado estacionário, e geralmente sobre condição de isoterma não linear; desta forma é necessário realizar experimentos em uma única coluna com soluções diluídas e concentradas para a determinação dos parâmetros de operação do Varicol®.

O estudo da sobrecarga da coluna auxilia na obtenção da isoterma não linear e que após simulação fornece dados suficientes para determinar a produtividade máxima da coluna cromatográfica. Para isso existem dois métodos de obtenção dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque: (i) sobrecarga de concentração – o volume de injeção é fixo e se varia a concentração da amostra injetada, e (ii) sobrecarga de volume – a concentração da amostra é fixa e se varia o volume de injeção.

Um fator importante para o estudo da sobrecarga é a solubilidade máxima do soluto na fase móvel, pois a escolha do método dependerá do valor da solubilidade devido à saturação da coluna ser dependente da massa que será injetada e do tamanho da coluna, seja analítica ou semi-preparativa.

Neste trabalho os experimentos foram conduzidos com sobrecarga de concentração, devido a solubilidade do mitotano na fase móvel 2-propanol/acetoneitrila (75:25 v/v) ter alcançado aproximadamente 360 mg/mL. Para o estudo de sobrecarga as concentrações da solução de mitotano variou na faixa de 100 a 300 mg/mL com incrementos de 50 mg/mL. Esta faixa foi escolhida para alcançar um toque lateral das curvas dos picos dos dois enantiômeros, o qual a linha da base formada pelo toque não poderia ultrapassar 90% da altura do pico mais baixo. Este procedimento está descrito no manual do Varicol® para obtenção dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque que está baseado no trabalho realizado por Rajendran⁵⁵.

Um método muito simples, que consiste na determinação dos pontos de inflexão do pico cromatográfico a partir da primeira derivada de cada pico cromatográfico, os quais os pontos de inflexão máximos correspondem aos valores dos tempos de retenção das frentes de onda de

choque (T_i). No caso da injeção de 20 mg, os valores para os pontos de inflexão do primeiro e segundo pico foram 3,042 e 4,264 min., respectivamente (Figura 4.7).

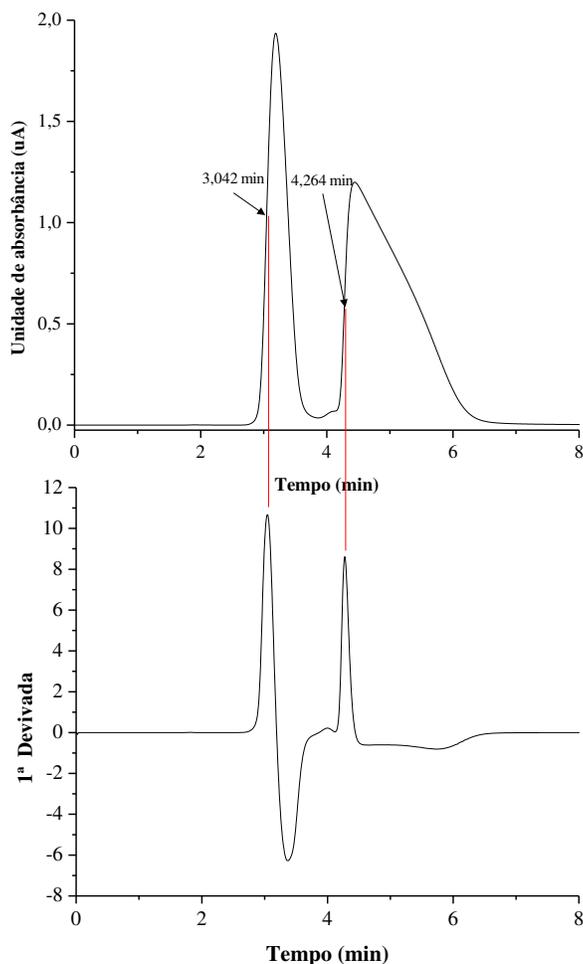


Figura 4.7 - Tempos de retenção das frentes das ondas de choque obtidos a partir da 1ª derivada do cromatograma de sobrecarga do mitotano. Condições experimentais – fase móvel: 2-propanol/acetonitrila 75:25 (v/v); vazão de 2,0mL/min; $\lambda=280$ nm; V_{inj} : 200 μ L; $T = 25$ °C; fase estacionária: *tris*(3,5-dimetilfenilcarmato) de amilose.

A Figura 4.8 ilustra os perfis de eluição das injeções de sobrecarga dos enantiômeros. Observou-se que o enantiômero S-(-)-mitotano possui uma variação nos tempos de retenção

insignificante com o aumento da sobrecarga comparado com R-(+)-mitotano, conforme Tabela 4.7, mediante a avaliação dos experimentos de sobrecarga da coluna. Esta condição indica que o primeiro composto possui uma baixa interação com a fase estacionária, visto que todas as bandas nas diferentes concentrações são aproximadamente simétricas e, além disso, para atingir a quantidade máxima de adsorção deste primeiro enantiômero eluído maiores volumes de alimentação são requeridos. No entanto, não é possível realizar tal procedimento devido à saturação dos sítios de adsorção ocasionado pelo segundo enantiômero R-(+)-mitotano, que apresenta uma maior interação com a fase estacionária como pode se observar na formação de uma cauda no processo de dessorção. Pode-se ainda verificar que a capacidade de saturação da fase estacionária foi superior a 60 mg de mitotano por grama de fase estacionária, visto que a coluna utilizada neste trabalho continha aproximadamente 6 grama de fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Este parâmetro de saturação está de acordo com estudo realizado por Francotte⁵¹ sobre a capacidade máxima de saturação das fases estacionárias quirais.

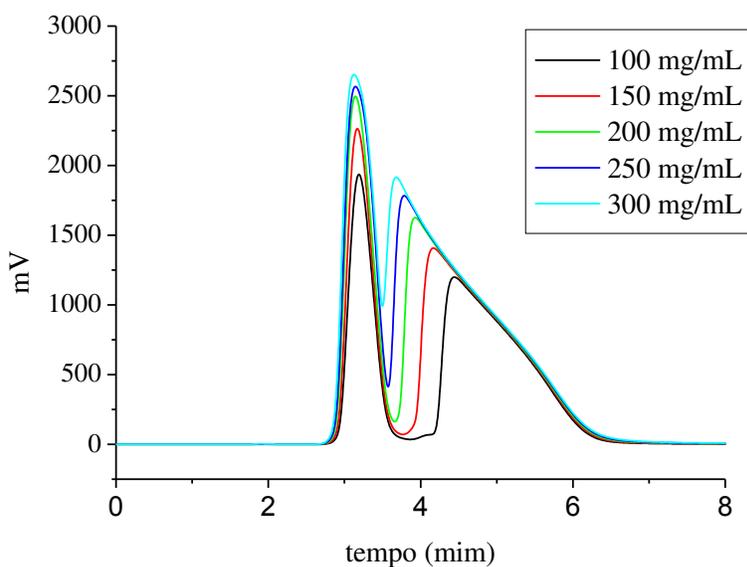


Figura 4.8 - Perfil de eluição de sobrecarga dos enantiômeros do mitotano em diferentes concentrações. Fase móvel isopropanol/acetonitrila (75:25 v/v); vazão de 2 mL.min⁻¹; $\lambda=280\text{nm}$.

Sendo assim, as injeções das soluções de mitotano preparadas resultaram nos picos cromatográficos, Figura 4.8, em que os dados dos picos obtidos foram utilizados na obtenção dos tempos de retenção das frentes das ondas de choque (T_i) para cada enantiômero. A Tabela 4.7 apresenta os T_i dos enantiômeros do mitotano nas condições avaliadas.

Tabela 4.7 - O tempos de retenção das frentes das ondas de choque obtidos em condições de sobrecarga da coluna *tris*(3,5-dimeitilfenilcarbamato) de amilose (10 x 1,0cm de d.i.), fase móvel 2-propanol/acetoneitrila (75:25 v/v), vazão de 2,0mL/min, $\lambda=280\text{nm}$ e V_{inj} : 200 μL .

V_{inj} (μL)	Conc. de cada enantiômero (mg/mL)	T_1 do componente menos retido (min)	T_2 do componente mais retido (min)
200	50	3,042	4,264
200	75	3,025	4,000
200	100	3,000	3,783
200	125	2,992	3,650
200	150	2,967	3,558

4.2.2. Determinação da isoterma pelo método dos tempos binários de retenção

As isotermas de equilíbrio obtidas a partir do programa Help® estão baseadas nos trabalhos de Nicoud e Seidel-Morgenstern⁶¹ e Rajendran e Chen⁵⁵, que na maioria dos casos os sítios de adsorção envolvendo separação de enantiômeros são competitivos e não competitivos, sendo assim, a isoterma que apresenta essas características é a isoterma de Langmuir competitiva modificada.

Para obtenção das isotermas pelo programa Help® é necessário determinar dados em condições analíticas. No sistema cromatográfico, descrito na Seção 3.5, foi injetado 20 μL da solução de mitotano com concentração de 0,2 mg/mL na coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato)

de amilose semi-preparativa, o qual a fase móvel passava com vazão de 2,00 mL/min através da coluna de diâmetro, comprimento e tamanho da partícula conhecida (Seção 3.3). Os tempos de retenção dos dois enantiômeros obtidos nas condições analíticas descritas foram de 3,21 min e 5,70 min para os enantiômeros S-(-) e R-(+)-mitotano, respectivamente. Esses tempos de retenção junto com o diâmetro da coluna, comprimento da coluna, tamanho da partícula e densidade do leite e os dados obtidos nos experimentos para determinar os tempos de retenção das frentes das ondas de choque descrito na Seção 4.2.1 (volume de injeção, vazão, concentração e tempo da frente da onda de choque de cada enantiômero) foram inseridos no programa Help® para executar uma simulação matemática. Durante a simulação o programa gerou os parâmetros das isotermas Langmuir competitivo modificado que estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Parâmetros da isoterma obtidos na temperatura de 25 °C com o programa Help® a partir do modelo Langmuir competitiva modificada.

Enantiômeros	λ_i	$q_i^*\beta_i$	$q_i^*(g/L)$	$\beta_i(L/g)$
S-(-)	0,5	0,1940	24	0,0082
R-(+)	0,5	1,2533	24	0,0522

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

Os dados da Tabela 4.8 geraram as isotermas apresentadas nas Equações 4.1 e 4.2 para o enantiômero S-(-) e R-(+)-mitotano, respectivamente. Observou-se que efetuando o somatório entre o primeiro e o segundo termo dessas isotermas geraram valores correspondente a constante Henry para os enantiômeros S-(-) e R-(+) de 0,694 e 1,75, respectivamente. No entanto, esses valores das constantes de Henry encontrados não se aproximaram dos valores apresentados na Seção 4.1.4, Tabela 4.4 para temperatura de 25 °C, isso significa que esse tipo de isoterma não se

aplica ao equilíbrio envolvido entre os enantiômeros do mitotano na fase líquida como os enantiômeros presentes na fase sólida.

Embora a isoterma Langmuir competitiva modificada não seja adequada para o analito em estudo esta foi utilizada na geração dos parâmetros das condições operacionais da unidade Varicol®, uma vez que o programa Help® não permite a mudança do modelo de isoterma, pois foi o único meio encontrado na geração dos parâmetros (vazão de alimentação, vazão de reciclo, vazão de eluente, vazão de extrato e outros) para uso na unidade Varicol®

$$q_S = 0,5C_S + \frac{0,1940C_S}{1 + 0,0081C_S + 0,0522C_R} \quad (4.1)$$

$$q_R = 0,5C_R + \frac{1,2533C_R}{1 + 0,0081C_S + 0,0522C_R} \quad (4.2)$$

Ensaio com as Equações 4.1 e 4.2 utilizando uma planilha de cálculo (Excel-Microsoft®) foram realizados para obtenção das curvas da isoterma. A Figura 4.9 representa as curvas obtidas. A linha preta representa a isoterma do enantiômero R-(+)-mitotano para uma variação de concentração entre 0,0 e 40 mg/mL. A linha vermelha representa a isoterma do S-(-)-mitotano para uma variação de concentração da mistura racêmica entre 0,0 e 40 mg/mL.

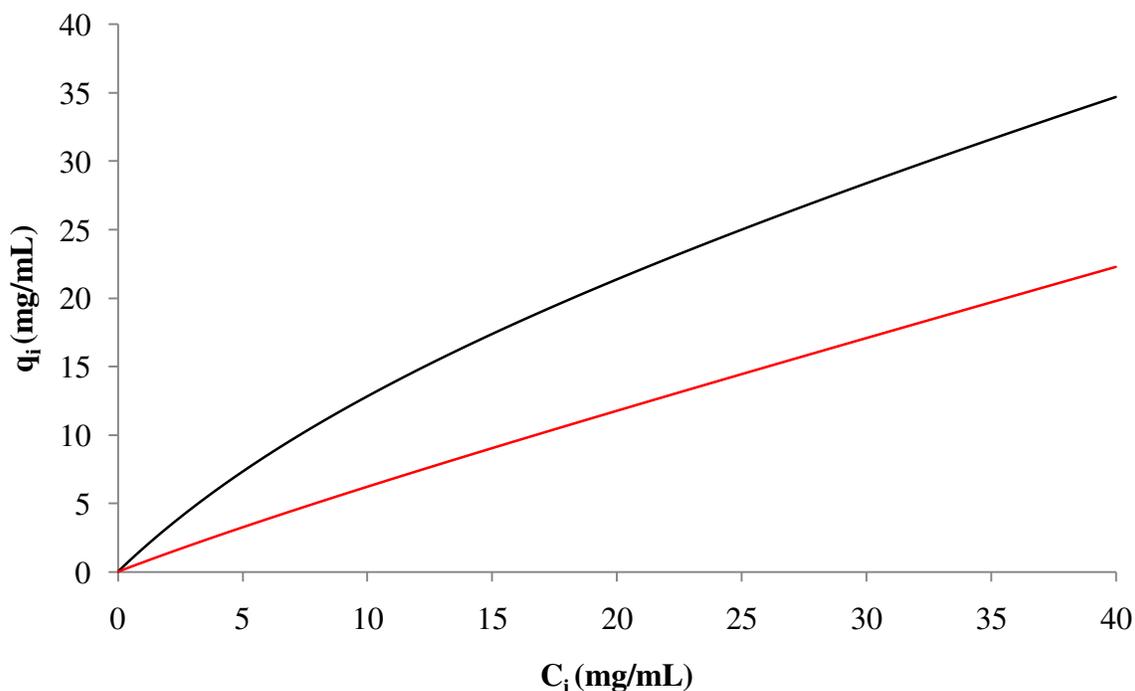


Figura 4.9 - Isotermas de adsorção dos enantiômeros do mitotano em fase estacionária tris(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose a 25 °C e vazão de 2,00 mL/min obtidas com o programa Help®.

Observou-se que a partir da simulação realizadas com as Equações 4.1 e 4.2 na planilha de cálculo, que a capacidade de adsorção máxima para o enantiômero R-(+) tende para um valor muito superior 35 g/L, enquanto que, para o enantiômero S-(-) não foi observado o quanto poderia adsorver na fase estacionária devido a curva tender para uma linearidade. Essa é a característica das isotermas Langmuir competitivo modificadas que tendem para uma linearidade devido ao primeiro termo da isoterma prevalecer perante o segundo termo.

4.3. Separação dos enantiômeros do mitotano

4.3.1. Separação por cromatografia em batelada

A separação dos enantiômeros do mitotano em batelada foi realizada com o intuito de comparar o processo em batelada com o processo de cromatografia contínua utilizando o Varicol®. Comparações quanto às purezas obtidas dos dois enantiômeros, o rendimento, a produtividade e o consumo de solventes foram levados em consideração.

Para a realização de uma separação em batelada o primeiro passo é a otimização das condições de separação do analito em escala analítica e nesta etapa estão incluídas a escolha da fase estacionária e a composição da fase móvel. A otimização para um fator de retenção (k) pequeno possibilita que a separação seja obtida em um menor tempo e com menor consumo de solventes. Já valores máximos para o fator de separação (α) e resolução (R_s) permitem que maiores quantidades do composto seja injetado na coluna cromatográfica sem perda de separação⁹⁸.

A fase quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi selecionada para a separação dos enantiômeros do mitotano, devido a melhor seletividade e também ao baixo fator de retenção e boa enantioseparação quando avaliada no modo polar orgânico.

O modo polar orgânico apresenta algumas vantagens de seu uso entre as quais se pode citar: boa solubilidade para as amostras e também esses solventes serem facilmente evaporados.

99,100

Para este trabalho realizaram-se 32 injeções de 200 μ L de uma solução de mitotano com concentração de 125 mg/mL em uma coluna *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. A separação foi realizada em uma vazão de 2,5 mL/min utilizando 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v) como fase móvel. A separação foi monitorada em $\lambda=280$ nm. O cromatograma obtido para separação em batelada está apresentado na Figura 4.10 e as coletas realizadas estão demarcadas.

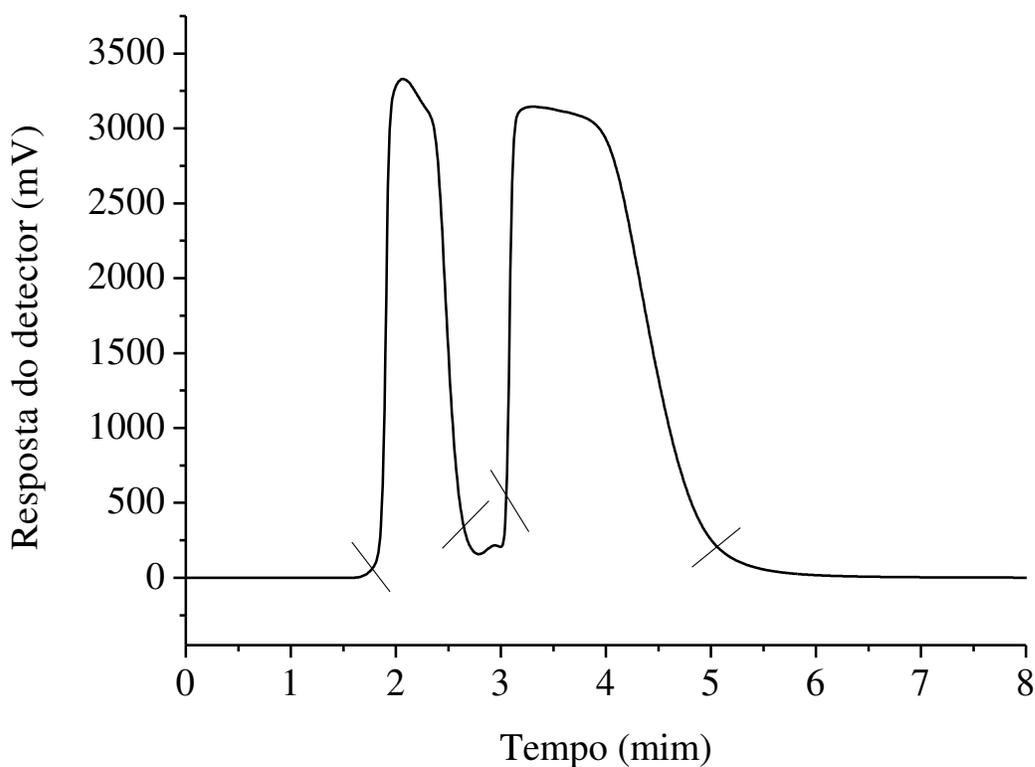


Figura 4.10 - Cromatograma da separação em batelada dos enantiômeros do mitotano. Coluna: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (10,0 x 1,0 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/Acetonitrila(75:25). Vazão: 2,5 mL/min; Volume de injeção: 200 μ L e λ :280nm.

Os cromatogramas apresentados Figura 4.11 ilustra a pureza dos picos obtidos pelo processo de separação dos enantiômeros por cromatografia em batelada, estes cromatogramas foram determinados na coluna analítica *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. (25 x 0,46 cm d.i.) e fase móvel 2-propanol/acetonitrila (75:25) com vazão de 1,0 mL/min e V_{inj} : 20 μ L e λ :270nm.

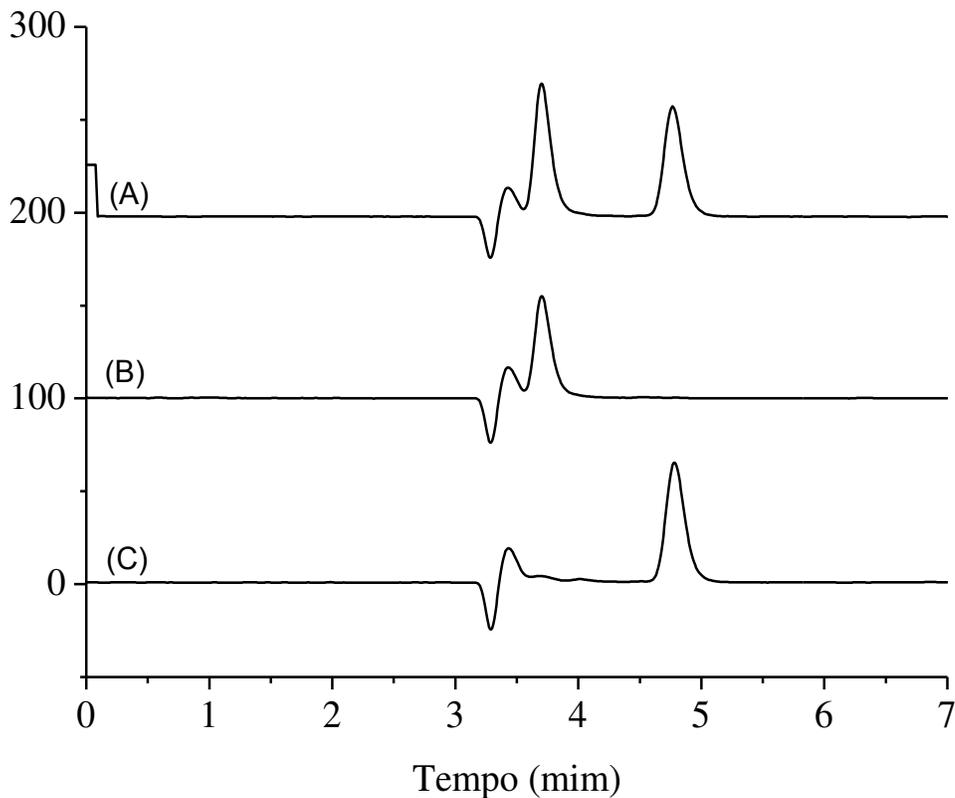


Figura 4.11 - Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do mitotano. Coluna analítica: tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (25 x 0,46 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25). Vazão: 1,0 mL/min; V_{inj} : 20 μ L e λ :270nm. (A) (\pm)-mitotano (C: 200 μ g/mL) (B) 1º enantiômero a eluir (C: 100 μ g/mL) e (C) 2º enantiômero a eluir (C: 100 μ g/mL).

A Tabela 4.9 apresenta os dados obtidos na separação em batelada do mitotano.

Tabela 4.9 - Resumo dos parâmetros obtidos na separação dos enantiômeros do mitotano em cromatografia de batelada.

DESEMPENHO	
Pureza do Enantiômero do S-(-)-mitotano	96,6 %
Pureza do Enantiômero R-(+)-mitotano	96,3 %
Consumo do solvente	1000 L/kg enantiômero
Produtividade S-(-)-mitotano	0,29 (g/g FEQ.dia)
Produtividade R-(+)-mitotano	0,28 (g/g FEQ.dia)

4.3.2. Separação por cromatografia contínua (Varicol®)

Para se obter sucesso na separação contínua utilizando a unidade Varicol® é ideal que as quantidades dos enantiômeros em cada seção sejam monitoradas continuamente, portanto é necessário acompanhar a concentração de refinado (composto menos retido) e extrato (composto mais retido) em cada seção no decorrer do processo. Desta maneira é possível verificar se a distribuição dos compostos pelas seções do processo de separação está sendo satisfatória.

Para realizar este acompanhamento da distribuição dos compostos foi necessário obter curvas de calibração para S-(-)-mitotano e R-(-)-mitotano. A quantificação das concentrações foi realizada a partir da área dos picos formados pelos enantiômeros.

As curvas de calibração foram lineares na faixa de 2,5 a 40 µg/mL para ambos os enantiômeros. O coeficiente de determinação obtido das curvas de calibração foi acima de 0,99. A precisão expressa pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 5% e a exatidão apresentou um desvio menor que 5% do valor nominal de concentração em todas as concentrações.

Para a separação do mitotano em cromatografia contínua utilizando o Varicol®, partiu-se dos dados experimentais obtidos em uma única coluna com diâmetro, comprimento e tamanho das partículas conhecidos. Esses dados experimentais foram os tempos de retenção dos

enantiômeros, os tempos de retenção das frentes das ondas de choque (Seção 4.2.1), os números de pratos em diferentes vazões em uma única temperatura, a solubilidade, a queda de pressão da coluna, a porosidade total, porosidade do leito e a porcentagem do primeiro componente dentro da mistura racêmica. Todos os dados citados foram inseridos no simulador computacional (Help®) que determinou os parâmetros da isoterma, o tempo de troca, o comprimento de cada seção, o consumo de solvente, a produtividade, a concentração da alimentação e calculou as vazões de entrada (alimentação e eluente) e saída (refinado e extrato), além disso, forneceu a vazão de reciclo e o perfil de concentração junto com a pureza teórica que pode ser alcançada pelo sistema Varicol®.

Alguns dados fornecidos da simulação são apresentados na Tabela 4.10 e o perfil de concentração ilustrado na Figura 4.12. Este perfil de concentração foi tomado como base na otimização da unidade Varicol®, visto que a partir dele se verifica se os dados experimentais estão de acordo com os simulados e se há necessidade de mudança das vazões em cada seção do sistema de separação contínua.

Na Figura 4.12 a linha contínua representa o perfil de concentração do componente mais retido (extrato) e a linha tracejada o componente menos retido (refinado).

Tabela 4.10 - Dados fornecidos por simulação no programa Help®.

Linhas de entradas e saídas (mL/mim)		Tamanho das seções	
Vazão de extrato (Q_{Ex})	5,59	Seção 1	0,98
Vazão de refinado (Q_{Ra})	1,82	Seção 2	1,81
Vazão de alimentação (Q_F)	1,59	Seção 3	1,02
Vazão de reciclo (Q_{Re})	12,99	Seção 4	2,19
Período ou tempo troca	Concentração de alimentação	Pureza dos Enantiômeros	
0,86 min	50 g/L	S-(-)	R-(+)
		99,81%	99,99%

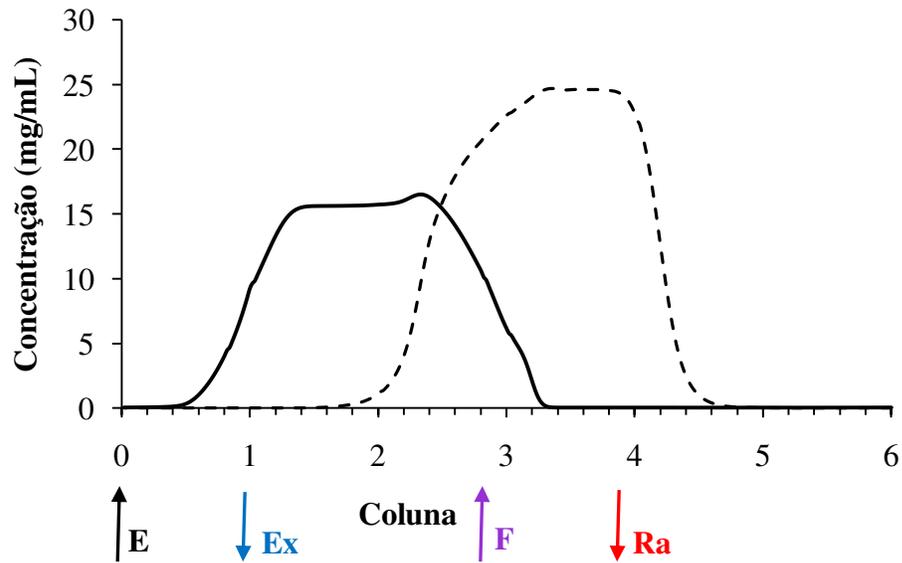


Figura 4.12 - Perfil de concentração simulado pelo programa Help®.

A vazão de eluente (Q_E) foi calculada a partir do balanço de massa, representado na Equação 4.3 e o valor obtido foi de 5,52 mL/min.

$$Q_E = Q_{Ra} + Q_{Ex} - Q_F \quad (4.3)$$

Os dados simulados foram inseridos no sistema Varicol® para realizar a separação dos enantiômeros do mitotano. Posteriormente aguardou-se o sistema atingir o estado estacionário, que foi de 14 ciclos, ou seja, aproximadamente 1 hora e 30 min e depois coletou as amostras nas linhas de extrato e refinado para verificar as purezas de ambos. No entanto, os valores das purezas encontradas não foram satisfatórios e muito diferentes dos valores simulados, sendo que o valor encontrado para o extrato foi de 40% e de refinado de 60%.

Como as purezas de extrato e refinado não foram altas como esperado, seguiu-se o manual de operação do Varicol® e este recomenda que os perfis de concentração devam ser determinados, a fim de ajustar as vazões experimentais empiricamente.

Para determinar o perfil de concentração do sistema, foram coletadas 12 amostras dentro do 20º ciclo e os pontos foram às posições 0,00; 0,25; 0,73; 0,98; 1,23; 1,91; 2,83; 3,35; 3,63; 3,88; 4,13 e 4,75 das colunas do sistema. Para estabelecer as posições de retirada das amostras foram calculados a partir dos valores simulados para cada seção. A Tabela 4.11 mostra como foram feito os cálculos das posições.

Tabela 4.11 – Posições de retirada das amostras de acordo com o período do ciclo.

Amostra	Posição (coluna)	Período de retirada da amostra dentro do ciclo (min)
1	0,0	0,90
2	$0,0 + 0,25 = 0,25$	0,69
3	$0,98 - 0,25 = 0,73$	0,27
4	0,98	0,06
5	$0,98 + 0,25 = 1,23$	5,00
6	$(0,98+2,79) \div 2 = 1,905$	4,40
7	2,79	3,66
8	$(2,79 + 3,81) \div 2 = 3,3$	3,22
9	$(3,81 - 0,25) = 3,56$	3,00
10	3,81	2,78
11	$3,81 + 0,25 = 4,06$	2,57
12	$6 - 0,25 = 5,75$	1,12

A Tabela 4.11 mostra também os períodos de retirada das amostras dentro do ciclo que foi cálculo de acordo como segue (Figura 4.13):

$$\boxed{\text{Número total de colunas do sistema}} + \boxed{\text{Posição da amostra no LMV em } t = 0} - \boxed{\text{Posição de retirada da amostra no Varicol® em } t \approx t_T + \Delta t/4} \times \boxed{\text{Tempo de troca}}$$

Figura 4.13 – Primeira expressão para calcular o período de retirada da amostra em cada posição do sistema Varicol®.

O período encontrado de acordo com o cálculo ilustrado na Figura 4.13 em cada posição de retirada da amostra no sistema Varicol® foi dividido por (Figura 4.14):

$$\boxed{\text{Número total de colunas do sistema}} \times \boxed{\text{Tempo de troca}}$$

Figura 4.14 – Segunda expressão para calcular o período de retirada da amostra em cada posição do sistema Varicol.

O resultado do resto da divisão corresponde ao período de retirada da amostra dentro do ciclo. No entanto quando o resto da divisão resultou no valor negativo foi considerado que o período fosse o resultado encontrado pela primeira expressão (Figura 4.13).

A posição da amostra no leito móvel verdadeiro (LMV) em $t = 0$ foi cálculo como segue (Figura 4.15):

$$\left[\boxed{\text{Número total de colunas do sistema}} - \boxed{\text{Tempo de troca}} + \boxed{\text{Posição da válvula de amostragem}} + \boxed{0,5} + \boxed{\frac{\text{Tempo morto}}{\text{Tempo de troca}}} \right] \div \boxed{\text{Número total de colunas do sistema}}$$

Figura 4.15 - Expressão para calcular a posição da amostra correspondente ao LMV em $t = 0$.

O resto do resultado da divisão apresentada na expressão (Figura 4.15) corresponde ao valor calculado na posição em que a amostra se encontra no LMV para $t = 0$. A posição da válvula de amostragem foi definida a de número 3. O tempo morto do sistema foi calculado de acordo com a Equação 4.4:

$$t_M = (V_M \times N_C) \div ((Q_1 \times N_1) + ((Q_1 - Q_E + Q_{Ra} - Q_F) \times N_2) + ((Q_1 - Q_E + Q_{Ra}) \times N_3) + ((Q_1 - Q_E) \times N_4)) \quad (4.4)$$

no qual t_M é o tempo morto, V_M , o volume morto, N_C , o número total de colunas no sistema, Q_1 , a vazão na seção 1, N_1 , o número de colunas na seção 1, N_2 , o número de colunas na seção 2, N_3 , número de colunas na seção 3 e N_4 , o numero de colunas na seção 4.

As expressões demonstradas servirão para definir em que tempo e posição foram retirados as amostras para determinar o perfil de concentração interna, o qual cada amostra foi analisada no sistema cromatográfico com uma coluna analítica para determinar a concentração dos enantiômeros do perfil. Esta concentração foi determinada a partir da interpolação com as concentrações da curva de calibração. Sendo assim, possível traçar o perfil interno de concentração do processo de separação dos enantiômeros do mitotano que está apresentado na Figura 4.16. A região de retirada do extrato e refinado mostra que ocorreu uma contaminação de ambos.

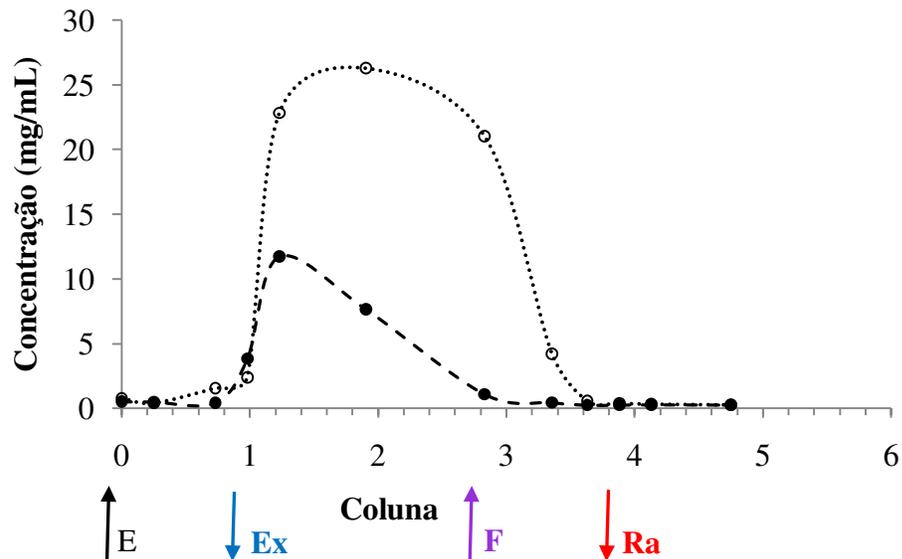


Figura 4.16 - Perfil interno de concentração no sistema Varicol® obtido experimentalmente.

Portando, as vazões de entrada, alimentação e eluente, junto com as vazões de saída, refinado e extrato, foram mudadas empiricamente até alcançar a melhor pureza dos enantiômeros. Vários ensaios de simulação e experimental foram realizados em diferentes condições, os quais os valores de Q_F , Q_{Ex} , Q_E , Q_{Rec} , Q_{Ra} obtidos com a melhor condição de separação dos enantiômeros do mitotano foram 0,48; 7,08; 7,39; 14,39 e 0,79 mL/mim, respectivamente.

A Figura 4.17 apresenta o novo perfil de concentração simulado pelo programa Help® juntamente com os dados obtidos experimentalmente. O perfil de concentração interno experimental descrito indica que o melhor ponto de retirada do refinado está localizado entre as colunas 3 e 4, enquanto para o extrato está localizado na coluna 1, com a alimentação sendo introduzida entre as colunas 2 e 3. Apesar de ocorrer fugas nas posições de retirada do extrato e do refinado foi possível obter purezas dos enantiômeros S e R de 97,34% e 96,84% respectivamente. A Tabela 4.12 mostra as condições operacionais do sistema Varicol® no qual foi obtida a melhor pureza entre os ensaios experimentais realizados.

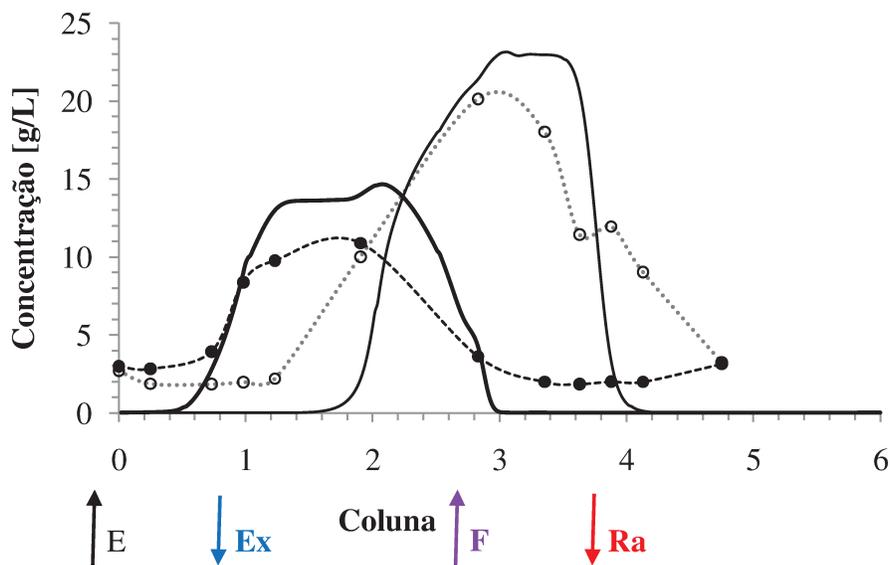


Figura 4.17 - Perfil interno de concentração dos enantiômeros do mitotano obtidos por simulação no Help® e experimentalmente na unidade Varicol®.

Tabela 4.12 - Condições operacionais otimizadas para o sistema Varicol®.

Linhas de entradas e saídas (mL/min)		Tamanho das seções	
Vazão de extrato (Q_{Ex})	7,08	Seção 1	0,98
Vazão de refinado (Q_{Ra})	0,79	Seção 2	1,46
Vazão de alimentação (Q_F)	0,48	Seção 3	1,32
Vazão de reciclo (Q_{Re})	14,39	Seção 4	1,29
Período ou tempo troca	Concentração de alimentação	Pureza dos Enantiômeros	
		S-(-)	R-(+)
0,82 min	50 g/L	97,34%	96,85%

O sistema Varicol® apresenta variações nas correntes de entrada e saída, pois um sistema automático de controle que compõe a unidade Varicol® ajusta as vazões de maneira que as mantém no limite de pureza desejada para cada enantiômero, esse sistema de controle funciona em conjunto com as unidades óptica de UV-VIS e polarímetro. O sinal do detector de polarímetro tem por objetivo auxiliar no controle das vazões entre as seções 2 e 3 de maneira que mantenha a vazão de alimentação constante. O sinal do detector de UV-VIS controla as vazões nas seções 1 e 4 de maneira que não ocorra fugas do extrato em direção ao refinado ou *vice-versa*.

A condição ótima de operação do Varicol ocorre quando o ponto zero do sinal do polarímetro está na mesma posição onde ocorre a alimentação e isso significa que as purezas dos enantiômeros são de 100%. As margens do sinal do UV-VIS mostram se está ocorrendo fugas das correntes de extrato e refinado, quando não ocorrem essas fugas significa que os enantiômeros não estão sendo contaminados entre si, obtendo-se alta pureza.

A Figura 4.18 mostra os sinais do UV-VIS (linha azul) e polarímetro (linha vermelha) obtidos experimentalmente no ciclo 55 em que a pureza dos enantiômeros estava entre 96 e 98%. Observou-se que o sinal do UV-VIS apresentou uma leve fuga na seção 1 o que ocasionou uma leve contaminação dos enantiômeros. Além disso, o ponto de alimentação encontrava-se

levemente afastado do ponto 50% que indica outro sinal de contaminação do extrato, a qual ocorre pela corrente alimentação.

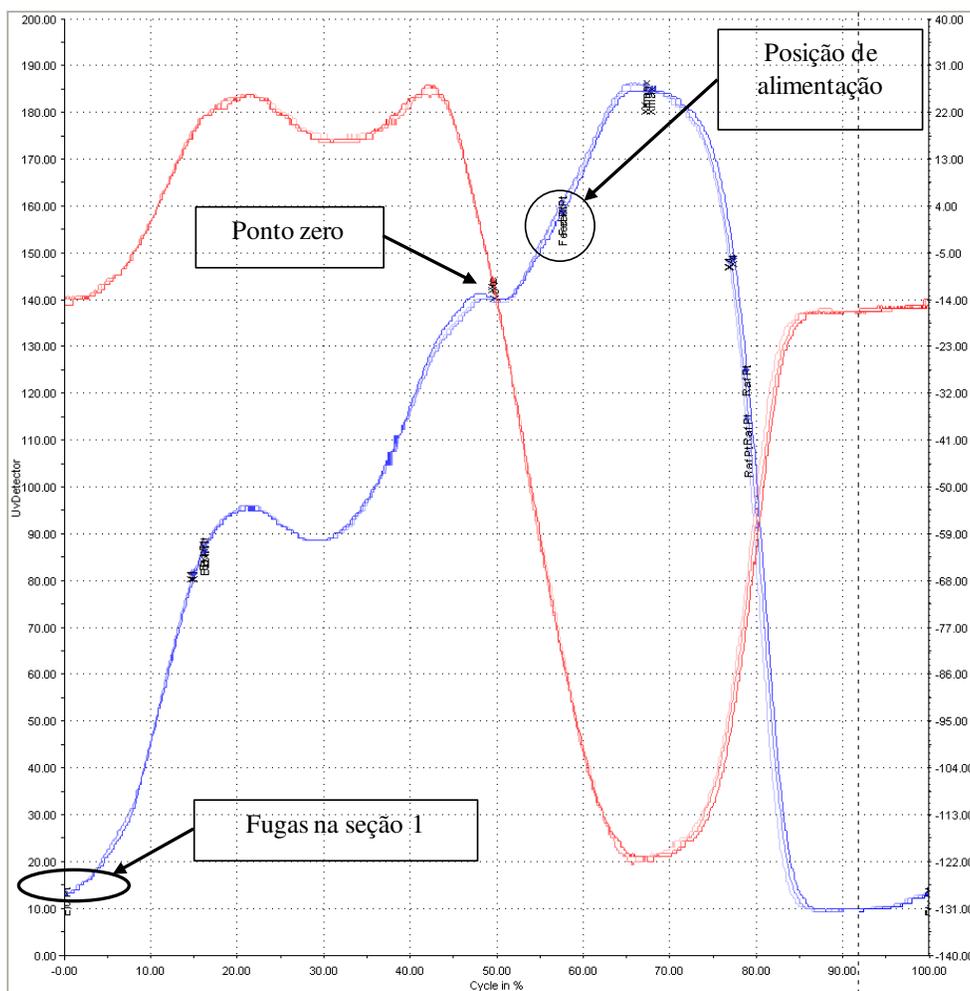


Figura 4.18 - Perfil experimental de concentração dos enantiômeros no ciclo 55 lido pelo detectores de UV-VIS e polarímetro.

Após se estabelecer essa condição de trabalho no processo Varicol®, o sistema continuou a ser alimentado e funcionando durante 66 ciclos, e as purezas dos enantiômeros foram acompanhadas no decorrer dos ciclos (Figura 4.19).

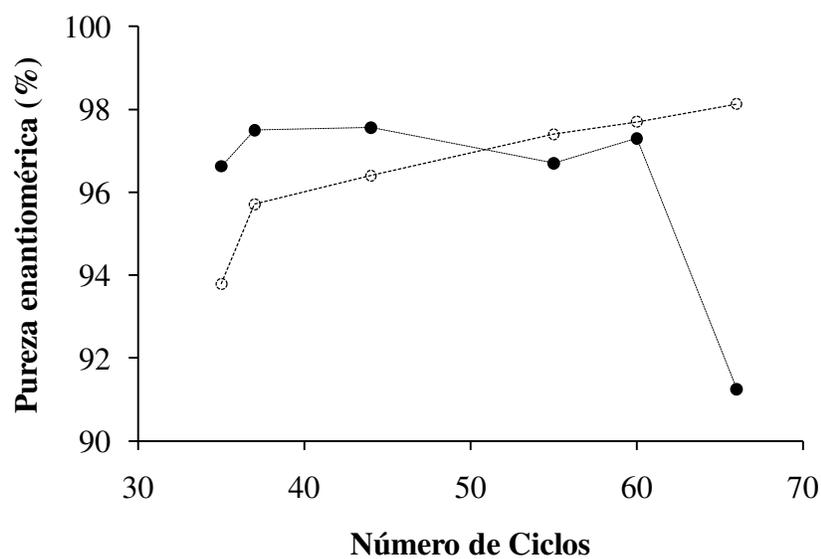


Figura 4.19 - Pureza enantiomérica obtida pelo número de ciclos da execução experimental na cromatografia de leito móvel Varicol® . (●) Extrato / R-(+)-mitotano; (○) Refinado/S-(-)-mitotano.

No entanto, no ciclo 66 ocorreu uma queda no índice da pureza do extrato como verificado na Figura 4.19, isso aconteceu devido ao sinal do sistema automático de controle do Varicol® entrar em colapso por causa de alguma variação da tensão elétrica, pois este sistema de controle é muito sensível a este tipo de variação. A causa provável da variação da tensão deve-se ao fato do sistema estar ligado diretamente à rede elétrica e a correção desse problema só seria possível ligando o equipamento em um retificador de tensão, como recomenda o fabricante.

Após o ciclo 66 o processo precisou ser reiniciado, pois o sistema automático de controle não conseguia reajustar as vazões que permitia manter a média de pureza entre 97% e 96% dos enantiômeros.

A Figura 4.20 ilustra o cromatograma do resultado obtido experimentalmente da pureza enantiomérica média do mitotano após a coleta de vários ensaios experimentais utilizando o sistema de cromatografia contínua.

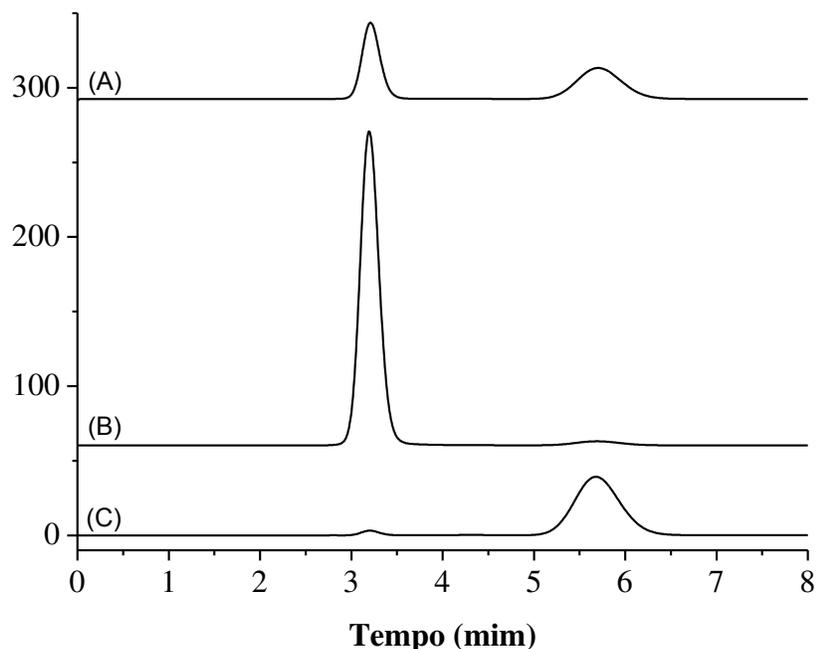


Figura 4.20 - Cromatograma para determinação da pureza enantiomérica do mitotano. Coluna analítica: *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (25 x 0,46 cm d.i.). Fase móvel: 2-propanol/acetonitrila (75:25 v/v). Vazão: 1,0 mL/min; Vinj: 20 μ L e λ :270nm. (A) (\pm)-mitotano (B) S(-)-mitotano e (C) R(+)-mitotano.

Outro fator relevante a ser considerado na cromatografia contínua é a produtividade e o consumo de solvente. De acordo com Welch *et al.*¹⁰¹ o índice de produtividade para o desempenho da cromatografia preparativa é normalmente expressa em unidades de quilogramas de enantiômero purificado por quilograma de fase estacionária (kkd). Considerando-se esta chave métrica, as produtividades de processamento obtidas para os enantiômeros S(-) e R(+)-mitotano foram de 1,18 e 0,72 kkd, respectivamente, comprovando que o procedimento experimental e o desempenho da unidade Varicol® foram muito bem sucedidos na separação da mistura racêmica de mitotano. A produtividade alcançada foi da ordem de 2 gramas de processamento da mistura racêmica por dia por grama de fase estacionária é considerada de bom valor quantitativo em comparação, por exemplo, com trabalhos recentes¹⁰².

Um bom nível para o consumo de solventes foi obtida no processo, no qual os resultados são apresentados na Tabela 4.13. O consumo de solvente foi na ordem de 160 L/kg enantiômero produzido que é considerado baixo comparado a separação em batelada que apresentou resultados gerais de consumo da ordem de 1000 L/kg de enantiômero. Para uma comparação com um caso similar, cita-se a separação da sertralina com o processo Varicol®, em que o valor consumido foi de 400 L/kg¹⁰².

Tabela 4.13 - Resumo dos parâmetros obtidos na separação dos enantiômeros do mitotano em um sistema Varicol®.

DESEMPENHO	
Pureza do Enantiômero do S-(-)-mitotano	97,34 %
Pureza do Enantiômero R-(+)-mitotano	96,85 %
Consumo do solvente	160 L/kg enantiômero
Produtividade S-(-)-mitotano	1,18 (g refinado/g FEQ.dia)
Produtividade R-(+)-mitotano	0,72 (g extrato/g FEQ.dia)

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a aplicabilidade da fase quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, no modo polar orgânico, para a separação dos enantiômeros do mitotano, apresentando excelentes valores de separação. Além disso, foram obtidos os enantiômeros do mitotano com alto grau de pureza enantiomérica, por meio da cromatografia em batelada e contínua.

A coluna utilizada neste trabalho demonstrou um alto desempenho de separação com sobrecarga de alimentação, em que alcançou uma saturação superior a 60 mg de mitotano/6g de fase estacionária e também constatou-se a eficiência da coluna por meio do cálculo do número de pratos teóricos que foram superiores a 2000.

O uso do processo Varicol® com seis colunas *tris*(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose resultou em um bom nível de purificação do mitotano, obtendo purezas de 97,0% para S-(-) e 96,8% para R-(+) nas correntes de refinado e extrato, respectivamente.

A aplicação das isotermas não lineares e os dados de sobrecarga da coluna foram úteis para determinar as condições de funcionamento e fornecer uma boa separação em toda faixa de concentrações de alimentação aqui utilizada. A unidade Varicol® teve uma produtividade de processamento da ordem de 1,18 kkd de S-(-) e 0,72 kkd de R-(+) mitotano, que é considerada um bom nível para cromatografia enantiosseletiva preparativa.

O cálculo das grandezas termodinâmicas mostrou-se importante para verificar se os valores de ΔH^0 e ΔS^0 variam com a temperatura e assim determinar se há mudança na conformação da fase estacionária quiral *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato), o que pode acarretar perda de seletividade. Portanto, a conformação da fase estacionária utilizada neste trabalho permaneceu inalterada na faixa de temperatura estudada, visto que as curvas de van't Hoff

obtidas para os dois enantiômeros foram lineares. A partir da grandeza termodinâmica ΔG^0 , a adsorção do enantiômero S-(-)-o,p'-DDD é menos espontânea, na faixa estudada de temperatura. Ao contrário do que ocorreu com o enantiômero R-(+)-o,p'-DDD, que apresentou um processo de adsorção é mais favorável, que consiste em uma maior retenção em menores temperaturas.

Em ensaios realizados com o objetivo de determinar a porosidade do leito foi verificado que o NaCl também pode ser usado para determinar a porosidade total da coluna cromatográfica com a fase estacionária *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Embora a porosidade do leito tenha sido determinada pelo método estimativo da correlação de Ruthven, ela apresentou valor coerente ao encontrado na literatura.

CAPÍTULO 6

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RIBEIRO, R.C.; MICHALKIEWICZ, E.L.; FIGUEIREDO, B.C.; DELACERDA, L.; SANDRINI, F.; PIANOVSKY, M.D.; SAMPAIO, G. & SANDRINI, R., "Adrenocortical tumors in children". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **33**(10): 1225, 2000.
2. SANDRINI, R.; RIBEIRO, R.C. & DELACERDA, L., "Childhood adrenocortical tumors". *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **82**(7): 2027, 1997.
3. LIBE, R.; FRATTICCI, A. & BERTHERAT, J., "Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management". *Endocrine-Related Cancer*. **14**(1): 13, 2007.
4. CANTILLANA, T.; LINDSTROM, V.; ERIKSSON, L.; BRANDT, I. & BERGMAN, A., "Interindividual differences in o,p '-DDD enantiomer kinetics examined in Gottingen minipigs". *Chemosphere*. **76**(2): 167, 2009.
5. KAJA, R.K.; SURENDRANATH, K.V.; RADHAKRISHNANAND, P. & SATYANARAYANA, P.V.V., "A Validated Stability Indicating LC Method for Mitotane in Bulk Drugs and Pharmaceutical Dosage Forms". *Chromatographia*. **69**(11-12): 1407, 2009.
6. ALLOLIO, B. & FASSNACHT, M., "Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update". *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **91**(6): 2027, 2006.
7. ANDERSEN, A.; KASPERLIK-ZALUSKA, A.A. & WARREN, D.J., "Determination of mitotane (o,p '-DDD) and its metabolites o,p '-DDA and o,p '-DDE in plasma by high-performance liquid chromatography". *Therapeutic Drug Monitoring*. **21**(3): 355, 1999.
8. ANDERSEN, A.; WARREN, D.J.; NOME, O.; VESTERHUS, L. & SLORDAL, L., "A high-pressure liquid-chromatographic method for measuring mitotane 1,1-(o,p'-dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethane and its metabolite 1,1-(o,p'-dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethene in plasma". *Therapeutic Drug Monitoring*. **17**(5): 526, 1995.
9. BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; PIA, A.; ANGELI, A.; DOGLIOTTI, L. & ITALIAN GRP STUDY ADRENAL, C., "Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma". *Cancer*. **83**(10): 2194, 1998.
10. PEREIRA, R.M.; MICHALKIEWICZ, E.; PIANOVSKI, M.A.; FRANÇA, S.N.; BOGUSZEWSKI, M.C.S.; CAT, I.; DE LACERDA FILHO, L. & SANDRINI, R., "Tratamento do tumor do córtex adrenal na infância". *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **49**: 747, 2005.
11. ASP, V.; CANTILLANA, T.; BERGMAN, A. & BRANDT, I., "Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p '-DDD (mitotane) in human adrenal cells". *Xenobiotica*. **40**(3): 177, 2010.

12. DING, G.S.; LIU, Y.; CONG, R.Z. & WANG, J.D., "Chiral separation of enantiomers of amino acid derivatives by high-performance liquid chromatography on a norvancomycin-bonded chiral stationary phase". *Talanta*. **62**(5): 997, 2004.
13. BROUGHTON, D.B. & GERHOLD, C.G., *Continuous sorption process employing fixed beds of sorbent and moving inlets and outlets*. 1961.
14. DA SILVA JUNIOR, I.J.; VEREDAS, V.; DOS 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*. **29**: 1027, 2006.
15. GOMES, P.S. & RODRIGUES, A.E., "Simulated Moving Bed Chromatography: From Concept to Proof-of-Concept". *Chemical Engineering & Technology*. **35**(1): 17, 2012.
16. SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms". *Journal of Chromatography A*. **1037**(1-2): 255, 2004.
17. LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; NICOUD, R.M. & BAILLY, M., "The "VARICOL" process: A new multicolumn continuous chromatographic process". *Separation Science and Technology*. **35**(12): 1829, 2000.
18. PARKIN, D.M.; STILLER, C.A.; DRAPER, G.J. & BIEBER, C.A., "The international incidence of childhood-cancer". *International Journal of Cancer*. **42**(4): 511, 1988.
19. PIANOVSKI, M.A.D.; MALUF, E.; DE CARVALHO, D.S.; RIBEIRO, R.C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; BOFFETTA, P.; ZANCANELLA, P. & FIGUEIREDO, B.C., "Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil". *Pediatric Blood & Cancer*. **47**(1): 56, 2006.
20. LATRONICO, A.C. & MENDONÇA, B.B., "Tumores adrenocorticais—Novas perspectivas". *Arq Bras Endocrinol Metab.* **48**: 642, 2004.
21. TERZOLO, M.; ANGELI, A.; FASSNACHT, M.; DAFFARA, F.; TAUCHMANOVA, L.; CONTON, P.A.; ROSSETTO, R.; BUCI, L.; SPERONE, P.; GROSSRUBATSCHER, E.; REIMONDO, G.; BOLLITO, E.; PAPOTTI, M.; SAEGER, W.; HAHNER, S.; KOSCHKER, A.-C.; ARVAT, E.; AMBROSI, B.; LOLI, P.; LOMBARDI, G.; MANNELLI, M.; BRUZZI, P.; MANTERO, F.; ALLOLIO, B.; DOGLIOTTI, L. & BERRUTI, A., "Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma". *New England Journal of Medicine*. **356**(23): 2372, 2007.
22. ZATELLI, M.C.; GENTILIN, E.; DAFFARA, F.; TAGLIATI, F.; REIMONDO, G.; CARANDINA, G.; AMBROSIO, M.R.; TERZOLO, M. & DEGLI UBERTI, E.C., "Therapeutic Concentrations of Mitotane (o,p'-DDD) Inhibit Thyrotroph Cell Viability and TSH Expression and Secretion in a Mouse Cell Line Model". *Endocrinology*. **151**(6): 2453, 2010.
23. BAUDIN, E.; PELLEGRITI, G.; BONNAY, M.; PENFORNIS, A.; LAPLANCHE, A.; VASSAL, G. & SCHLUMBERGER, M., "Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'-DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma". *Cancer*. **92**(6): 1385, 2001.
24. BERGENSTAL, D.M.; HERTZ, R.; LIPSETT, M.B. & MOY, R.H., "Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-DDD". *Annals of Internal Medicine*. **53**(4): 672, 1960.
25. VANSLOOTEN, H.; MOOLENAAR, A.J.; VANSETERS, A.P. & SMEENK, D., "The Treatment of Adrenocortical Carcinoma with ortho, para'-DDD - Prognostic Simplifications of Serum Level Monitoring". *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*. **20**(1): 47, 1984.

26. HOUGH, A.J.; HOLLIFIELD, J.W.; PAGE, D.L. & HARTMANN, W.H., "Prognostic factors in adrenal-cortical tumors - Mathematical-analysis of clinical and morphologic data". *American Journal of Clinical Pathology*. **72**(3): 390, 1979.
27. HUTTER, A.M. & KAYHOE, D.E., "Adrenal cortical carcinoma - Results os treatment with o,p' DDD in 138 patients". *American Journal of Medicine*. **41**(4): 581, 1966.
28. HERMSEN, I.G.C.; DEN HARTIGH, J. & HAAK, H.R., "Mitotane serum level analysis; good agreement between two different assays". *Clinical Endocrinology*. **73**(2): 271, 2010.
29. CANTILLANA, T. & ERIKSSON, L., "(2S)-1,1-Dichloro-2-(2-chlorophenyl)2-(4-chlorophenyl)ethane". *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online*. **65**: O297, 2009.
30. BROCKS, D.R. & JAMALI, F., "Stereochemical aspects of pharmacotherapy". *Pharmacotherapy*. **15**(5): 551, 1995.
31. CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L. & AGRANAT, I., "Trends in the development of chiral drugs". *Drug Discovery Today*. **9**(3): 105, 2004.
32. RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M.C.; FERIOLI, V. & GAMBERINI, G., "Properties of the racemic species of verapamil hydrochloride and gallopamil hydrochloride". *International Journal of Pharmaceutics*. **178**(1): 111, 1999.
33. BONATO, P.S. & JABOR, V.A.R., "Análise Enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar". *Química Nova*. **38**(4): 683, 2005.
34. BRASIL, *Resolução-RDC nº 11*. 2011.
35. BORTOCAN, R.; LANCHOTE, V.L.; CESARINO, E.J. & BONATO, P.S., "Enantioselective analysis of disopyramide and mono-N-dealkyldisopyramide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography on an amylose-derived chiral stationary phase". *Journal of Chromatography B*. **744**(2): 299, 2000.
36. DUTHION, B.; METRO, T.-X.; PARDO, D.G. & COSSY, J., "Rearrangement of N-alkyl 1,2-amino alcohols. Synthesis of (S)-toliprolol and (S)-propanolol". *Tetrahedron*. **65**(33): 6696, 2009.
37. HASHEM, H.; TRUENDELBERG, C.; ATTEF, O. & JIRA, T., "Effect of chromatographic conditions on liquid chromatographic chiral separation of terbutaline and salbutamol on Chirobiotic V column". *Journal of Chromatography A*. **1218**(38): 6727, 2011.
38. NEUNZIG, I.; GOEHRINGA, A.; DRAGAN, C.-A.; ZAPP, J.; PETERS, F.T.; MAURER, H.H. & BUREIK, M., "Production and NMR analysis of the human ibuprofen metabolite 3-hydroxyibuprofen". *Journal of Biotechnology*. **157**(3): 417, 2012.
39. HANNA, G.M. & LAUCAM, C.A., "Determination of the optical purity of indacrinone by proton nuclear magnetic-resonance spectroscopy using chiral lanthanide chelates". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **7**(8): 919, 1989.
40. LIMA, V.L.E., "Os fármacos e a quiralidade: Uma breve abordagem". *QUÍMICA NOVA*. **20**(6): 657, 1997.
41. CASS, Q.B. & DEGANI, A.L.G., *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. 1º ed. 2002, São Carlos: EdUFSCar.
42. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S., *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*, in *Fundamentos de Cromatografia*, UNICAMP, E., Editor. 2006: Campinas. p. 273.
43. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. & GLAJCH, J.L., *Practical HPLC Method Development* 2ª ed. 1997, New York: Jonhn Wiley and Sons Inc. 765p.

44. BERTHOD, A., "Chiral recognition mechanisms". *Analytical Chemistry*. **78**(7): 2093, 2006.
45. LAMMERHOFER, M., "Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases". *Journal of Chromatography A*. **1217**(6): 814, 2010.
46. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; TIRITAN, M.E.; MATLIN, S.A.; CURRAN, D.P. & BALOG, A., "Enantiomeric resolution by HPLC of axial chiral amides using amylose Tris (S)-1-phenylethylcarbamate". *Chirality*. **9**(2): 109, 1997.
47. OKAMOTO, Y. & KAIDA, Y., "Resolution by high-performance liquid-chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases". *Journal of Chromatography A*. **666**(1-2): 403, 1994.
48. YASHIMA, E., "Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation". *Journal of Chromatography A*. **906**(1-2): 105, 2001.
49. ALI, I. & ABOUL-ENEIN, H.Y., *Role of polysaccharides in chiral separations by liquid chromatography and capillary electrophoresis*, in *Chiral separation techniques*. 2007, G. Subramanian. p. 29.
50. FRANCOTTE, E., "Enantioselective Chromatography: From its Emergence to its Successful Implementation in the Pharmaceutical Environment". *Chimia*. **63**(12): 867, 2009.
51. FRANCOTTE, E.R., "Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers". *Journal of Chromatography A*. **906**(1-2): 379, 2001.
52. GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S.G. & KATTI, A.M., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. 2^a. ed. 1994, Boston: Academic Press.
53. MAZZOTTI, M.; STORTI, G. & MORBIDELLI, M., "Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations". *Journal of Chromatography A*. **769**(1): 3, 1997.
54. GENTILINI, A.; MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M. & MORBIDELLI, M., "Optimal operation of simulated moving-bed units for non-linear chromatographic separations - II. Bi-Langmuir isotherm". *Journal of Chromatography A*. **805**(1-2): 37, 1998.
55. RAJENDRAN, A. & CHEN, W.D., "Binary retention time method for rapid determination of competitive Langmuir isotherm parameters". *Separation and Purification Technology*. **67**(3): 344, 2009.
56. FORSSEN, P.; ARNELL, R. & FORNSTEDT, T., "An improved algorithm for solving inverse problems in liquid chromatography". *Computers & Chemical Engineering*. **30**(9): 1381, 2006.
57. ARAUJO, J.M.M.; RODRIGUES, R.C.R. & MOTA, J.P.B., "Determination of competitive isotherms of enantiomers by a hybrid inverse method using overloaded band profiles and the periodic state of the simulated moving-bed process". *Journal of Chromatography A*. **1189**(1-2): 302, 2008.
58. MAZZOTTI, M., "Equilibrium theory based design of simulated moving bed processes for a generalized Langmuir isotherm". *Journal of Chromatography A*. **1126**(1-2): 311, 2006.
59. RAJENDRAN, A. & CHEN, W., "Binary retention time method for rapid determination of competitive Langmuir isotherm parameters". *Separation and Purification Technology*. **67**(3): 344, 2009.
60. MIHLBACHLER, K.; DE JESUS, M.A.; KACZMARSKI, K.; SEPANIAK, M.J.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. & GUIOCHON, G., "Adsorption behavior of the (+/-)-Troger's base enantiomers in the phase system of a silica-based packing coated with amylose

- tri(3,5-dimethyl carbamate) and 2-propanol and molecular modeling interpretation". *Journal of Chromatography A*. **1113**(1-2): 148, 2006.
61. NICOUD, R.M. & SEIDEL-MORGENSTERN, A., "Adsorption experimental determination and application to preparative chromatography". *Isolation & Purification*. **2**: 165, 1996.
62. GOLSHANSHIRAZI, S. & GUIOCHON, G., "Experimental characterization of the elution profiles of high-concentration chromatographic bands using the analytical solution of the ideal model". *Analytical Chemistry*. **61**(5): 462, 1989.
63. CHING, C.B.; ARLT, W.; LISSO, M. & WOZNY, G., "Kinetic and equilibrium study of the enantioseparation of fenopfen in a batch setup". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **39**(11): 4365, 2000.
64. JUZA, M.; MAZZOTTI, M. & MORBIDELLI, M., "Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology". *Trends in Biotechnology*. **18**(3): 108, 2000.
65. WILKE, C.R. & CHANG, P., "Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions". *AIChE Journal*. **1**(2): 264, 1955.
66. GUIOCHON, G., "The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. **1126**(1-2): 6, 2006.
67. POLING, E.; PRAUSNITZ, J.P. & O'CONNELL, J.P., *The Properties of Gases and Liquids*. 5 ed. 2001: Bruce
68. ZHOU, Y.; LI, L.; LIN, K.; ZHU, X. & LIU, W., "Enantiomer Separation of Triazole Fungicides by High-Performance Liquid Chromatography". *Chirality*. **21**(4): 421, 2009.
69. ZHANG, D.D.; LI, F.M.; KIM, D.H.; CHOI, H.J. & HYUN, M.H., "Resolution of beta-blockers on a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid: Unusual temperature effect". *Journal of Chromatography A*. **1083**(1-2): 89, 2005.
70. PETER, A.; VEKES, E. & ARMSTRONG, D.W., "Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase". *Journal of Chromatography A*. **958**(1-2): 89, 2002.
71. CIRILLI, R.; ALCARO, S.; FIORAVANTI, R.; SECCI, D.; FIORE, S.; LA TORRE, F. & ORTUSO, F., "Unusually high enantioselectivity in high-performance liquid chromatography using cellulose tris(4-methylbenzoate) as a chiral stationary phase". *Journal of Chromatography A*. **1216**(22): 4673, 2009.
72. ILISZ, I.; PATAJ, Z.; BERKECZ, R.; MISICKA, A.; TYMECKA, D.; FULOP, F.; CHOI, H.J.; HYUN, M.H. & PETER, A., "High-performance liquid chromatographic enantioseparation of beta(2)-amino acids using a long-tethered (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phase". *Journal of Chromatography A*. **1217**(7): 1075, 2010.
73. DA SILVA, I.J.J.; SARTOR, J.P.; PIRES ROSA, P.C.; DE VEREDAS, V.; BARRETO, A.G.J. & SANTANA, C.C., "High-performance liquid chromatographic separation of rolipram, bupivacaine and omeprazole using a tartardiamide-based stationary phase Influence of flow rate and temperature on the enantioseparation". *Journal of Chromatography A*. **1162**(1): 97, 2007.
74. YANG, J.; LU, X.; BI, Y.; QIN, F. & LI, F., "Chiral separation of duloxetine and its R-enantiomer by LC". *Chromatographia*. **66**(5-6): 389, 2007.
75. ROJKOVICOVA, T.; LEHOTAY, J.; KRUPCIK, J.; FEDURCOVA, A.; CIZMARIK, J. & ARMSTRONG, 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*. **27**(11): 1653, 2004.
76. SCHLAUCH, M. & FRAHM, A.W., "A thermodynamic study of the temperature-dependent elution order of cyclic alpha-amino acid enantiomers on a copper(II)-D-penicillamine chiral stationary phase". *Analytical Chemistry*. **73**(2): 262, 2001.
77. ANDERSSON, S.; BALMER, K. & PERSSON, B.A., "Chromatographic resolution of organic acids using the Kromasil-CHI-TBB chiral stationary phase". *Chirality*. **11**(5-6): 420, 1999.
78. "FDA Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs". *Chirality*. **4**(5): 338, 1992.
79. SIITONEN, J.; SAINIO, T. & RAJENDRAN, A., "yBypass chromatography - design and analysis of an improved strategy for operating batch chromatography processes". *Journal of Chromatography A*. **1230**: 77, 2012.
80. TOUMI, A.; HANISCH, F. & ENGELL, S., "Optimal operation of continuous chromatographic processes: Mathematical optimization of the VARICOL process". *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **41**(17): 4328, 2002.
81. KENNEDY, J.H.; BELVO, M.D.; SHARP, V.S. & WILLIAMS, J.D., "Comparison of separation efficiency of early phase active pharmaceutical intermediates by steady state recycle and batch chromatographic techniques". *Journal of Chromatography A*. **1046**(1-2): 55, 2004.
82. NICOUD, R.M.; FUCHS, G.; ADAM, P.; BAILLY, M.; KUSTERS, E.; ANTIA, F.D.; REUILLE, R. & SCHMID, E., "Preparative-Scale Enantioseparation of a Chiral Epoxide - Comparison of Liquid Chromatography and Simulated Moving-Bed Adsorption Technology". *Chirality*. **5**(4): 267, 1993.
83. CERUTT, E.L., *Separação de compostos petroquímicos em unidades de leito móvel simulado*, in *Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimento*. 2003, Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. p. 117.
84. YU, W.F.; HIDAJAT, K. & RAY, A.K., "Optimal operation of reactive simulated moving bed and Varicol systems". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **78**(2-3): 287, 2003.
85. KATSUO, S.; LANGEL, C.; SANDRE, A.L. & MAZZOTTI, M., "Intermittent simulated moving bed chromatography: 3. Separation of Troger's base enantiomers under nonlinear conditions". *Journal of Chromatography A*. **1218**(52): 9345, 2011.
86. NEGAWA, M. & SHOJI, F., "Optical Resolution by Simulated Moving-Bed Adsorption Technology". *Journal of Chromatography*. **590**(1): 113, 1992.
87. PAIS, L.S.; MATA, V.G. & RODRIGUES, A.E., *Simulated moving bed and related techniques*, in *Preparative Enantioselective Chromatography*. 2005, Blackwell Publishing Ltd: Oxford. p. 177.
88. STRUBE, J.; HAUMREISSER, S.; SCHMIDT-TRAUB, H.; SCHULTE, M. & DITZ, R., "Comparison of batch elution and continuous simulated moving bed chromatography". *Organic Process Research & Development*. **2**(5): 305, 1998.
89. PEPPER, S.; JOHANNSEN, M. & BRUNNER, G., "Preparative chromatography with supercritical fluids Comparison of simulated moving bed and batch processes". *Journal of Chromatography A*. **1176**(1-2): 246, 2007.
90. RODRIGUES, R.C.R.; ARAUJO, J.M.M. & MOTA, J.P.B., "Optimal design and experimental validation of synchronous, asynchronous and flow-modulated, simulated

- moving-bed processes using a single-column setup". *Journal of Chromatography A*. **1162**(1): 14, 2007.
91. TOUMI, A.; ENGELL, S.; LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; NICOUD, R.M. & BAILLY, M., "Optimization of simulated moving bed and Varicol processes". *Journal of Chromatography A*. **1006**(1-2): 15, 2003.
92. WONGSO, F.; HIDAJAT, K. & RAY, A.K., "Optimal operating mode for enantioseparation of SB-553261 racemate based on simulated moving bed technology". *Biotechnology and Bioengineering*. **87**(6): 704, 2004.
93. PAIS, L.S. & RODRIGUES, A.E., "Design of simulated moving bed and Varicol processes for preparative separations with a low number of columns". *Journal of Chromatography A*. **1006**(1-2): 33, 2003.
94. ANVISA, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. 2003.
95. DA SILVA JUNIOR, A.C., *Separação cromatográfica do o,p'- diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose e tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose*, in *Faculdade de Engenharia Química*. 2010, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp: Campinas.
96. ZABKA, M. & RODRIGUES, A.E., "Measurement of pore diffusivity of R,S-alpha-Tetralol enantiomers in chiral adsorbent CHIRALPAK AD by zero length column method". *Separation and Purification Technology*. **57**(1): 74, 2007.
97. GOOSSENS, J.F.; FOULON, C.; BAILLY, C.; BIGG, D.C.H.; BONTE, J.P. & VACCHER, C., "Chiral resolution of enantiomers of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases". *Chromatographia*. **59**(5-6): 305, 2004.
98. MILLER, L.; ORIHUELA, C.; FRONEK, R.; HONDA, D. & DAPREMONT, O., "Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale". *Journal of Chromatography A*. **849**(2): 309, 1999.
99. BELAZ, K.R.A.; COIMBRA, M.; BARREIRO, J.C.; MONTANARI, C.A. & CASS, Q.B., "Multimilligram enantioresolution of sulfoxide proton pump inhibitors by liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phase". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**(1): 81, 2008.
100. SOUSA, M.E.; TIRITAN, M.E.; BELAZ, K.R.A.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M.S.J.; CASS, Q.B. & PINTO, M.M.M., "Multimilligram enantioresolution of low-solubility xanthonolignoids on polysaccharide chiral stationary phases using a solid-phase injection system". *Journal of Chromatography A*. **1120**(1-2): 75, 2006.
101. WELCH, C.J.; SAJONZ, P.; SPENCER, G.; LEONARD, W.; HENDERSON, D.; SCHAFER, W. & BEMARDONI, F., "Microscale HPLC predicts preparative performance at millionfold scale". *Organic Process Research & Development*. **12**(4): 674, 2008.
102. QUALLICH, G.J., "Development of the commercial process for Zolofl((R))/sertraline". *Chirality*. **17**: S120, 2005.